

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN

FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE

XXIV CICLO

COORDINATORE: Prof. Gianni Marone



***ALTERAZIONI DEL METABOLISMO POSTPRANDIALE NEL
DIABETE MELLITO: ASPETTI FISIOPATOLOGICI E CLINICI***

TUTOR

Prof.ssa A.A. Rivellese

CANDIDATA

Dott.ssa Lutgarda Bozzetto

INDICE

RIASSUNTO	pag. 4
INTRODUZIONE	8
1. Lipemia postprandiale nel diabete tipo 2	11
1.1 Il ruolo del tessuto adiposo	11
1.1.1 La distribuzione del grasso addominale.....	11
1.1.2 La funzione paracrina ed endocrina.....	12
1.2 Il ruolo del fegato.....	13
1.2.1 NAFLD.....	13
1.2.2 NAFLD e diabete.....	14
1.2.3 Grasso epatico e lipemia postprandiale.....	14
1.3 Il ruolo dell'intestino.....	15
2. Glicemia postprandiale nel diabete tipo 1.....	15
2.1 Il ruolo della terapia insulinica	16
2.2 La composizione del pasto.....	17
3. Strategie terapeutiche della dislipidemia postprandiale.....	19
3.1 La dieta.....	19
3.2 L'attività fisica.....	19
3.3 I farmaci	22
4. Correzione dell'iperglicemia postprandiale	24
4.1 Il ruolo dell'indice glicemico degli alimenti.....	25
OBIETTIVI.....	25
1. Obiettivi generali.....	25
2. Obiettivi specifici.....	26
METODI.....	28
1. Valutazione della lipemia postprandiale.....	28
2. Determinazione del contenuto epatico di grasso.....	32
3. Determinazione della distribuzione del grasso addominale.....	33
4. Altre determinazioni.....	34

STUDI.....	35
CONCLUSIONI.....	68
BIBLIOGRAFIA.....	69
APPENDICE.....	82

RIASSUNTO

Il diabete mellito sia tipo 2 che tipo 1 si associa ad alterazioni del metabolismo postprandiale, che rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari e complicanze microangiopatiche.

La dislipidemia postprandiale è un'alterazione molto frequente nel diabete tipo 2 di cui ancora non si conoscono completamente i meccanismi fisiopatologici né tantomeno le possibili strategie terapeutiche.

Nel diabete tipo 1 le alterazioni postprandiali sono costituite principalmente dalla variabilità della risposta glicemica. L'ottimizzazione della terapia insulinica è l'unica strategia possibile per la correzione di queste alterazioni. La composizione del pasto ed in particolare l'indice glicemico degli alimenti sono una criticità per questa ottimizzazione.

Al fine di chiarire queste problematiche gli obiettivi della ricerca svolta durante il dottorato sono stati:

- 1) Studiare la relazione tra diabete mellito tipo 2, contenuto epatico di grasso e distribuzione del grasso addominale indipendentemente da obesità ed insulino-resistenza. (**Studio 1** pubblicato su European Journal of Clinical Investigation, 2011)
- 2) Valutare gli effetti sulla dislipidemia postprandiale e sul grasso epatico di due diete isocaloriche -una ricca in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e una ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico (CHO/fibre)- (**Studio 2** pubblicato su Diabetes Care 2009, e **Studio 3** sottomesso alla rivista Diabetes Care).
- 3) Valutare gli effetti sulla steatosi epatica e sulla dislipidemia postprandiale, di un programma di attività fisica aerobica da solo o in associazione ad una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e una ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico (CHO/fibre), indipendentemente dal calo ponderale (**Studio 3** sottomesso alla rivista Diabetes Care).
- 4) Studiare gli effetti sulla lipemia postprandiale di un trattamento di 6 settimane con l'associazione simvastatina+ezetimibe (**Studio 4** pubblicato su Atherosclerosis, 2011)
- 5) Studiare gli effetti dell'indice glicemico del pasto sulla risposta glicemica postprandiale in pazienti con diabete mellito tipo 1 in trattamento con microinfusore di insulina (**Studio 5** pubblicato su Diabetic Medicine, 2010).

Studio 1. Sono stati studiati 13 uomini con obesità e diabete (OD), 10 con obesità e senza diabete (OND), e 9 sani (C) di età compresa tra 28 e 65 anni, normotrigliceridemici a digiuno. I partecipanti OD erano in buon controllo glico-metabolico ($HbA1c = 6.8 \pm 0.8\%$) ($M \pm DS$) con dieta o dieta+ metformina. Il contenuto epatico di grasso è stato misurato mediante 1H -spettroscopia di risonanza magnetica, la distribuzione del grasso addominale mediante risonanza magnetica addominale e l'insulino-sensibilità mediante clamp euglicemico iperinsulinemico.

I soggetti DO e NDO erano comparabili per livelli di insulino-resistenza sistemica, IMC e circonferenza vita, che erano più alti rispetto ai controlli ($P < 0.001$). I soggetti OD avevano un contenuto maggiore di grasso epatico ($11.9 \pm 7.0\%$) rispetto a OND ($5.2 \pm 2.8\%$, $p < 0.05$) e C ($1.6 \pm 1.0\%$, $p < 0.001$). Il grasso addominale era maggiore in OD e OND che in C (grasso viscerale: OD 3184 ± 843 , OND 2843 ± 1378 vs. C 1212 ± 587 cm^3 , $p < 0.001$; sottocutaneo: OD 4029 ± 362 , OND 5197 ± 1398 vs. C 2312 ± 626 cm^3 , $p < 0.001$). Il grasso viscerale non era significativamente diverso nei due gruppi di pazienti con obesità e il grasso sottocutaneo era significativamente minore nei DO che nei OND ($p < 0.05$).

Studio 2. Diciotto pazienti con diabete tipo 2 hanno seguito, secondo un disegno randomizzato di tipo cross-over, due diete isoenergetiche, una relativamente ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico (Dieta CHO/fibre) ed un'altra ricca in MUFA, povera in CHO e fibre e ad alto indice glicemico (Dieta MUFA) per un mese ciascuna. Alla fine di ciascun trattamento dietetico sono stati valutati i livelli di lipemia postprandiale dopo un pasto test di composizione simile al trattamento seguito. La dieta CHO/fibre ha ridotto significativamente la risposta postprandiale sia dei trigliceridi che del colesterolo dei chilomicroni (area incrementale postprandiale Colesterolo: 2.0 ± 0.3 vs. 3.2 ± 0.6 $mg/dl \times 6h$, Tg: 63 ± 31 vs. 91 ± 51).

Studio 3 Secondo un disegno fattoriale 2×2 randomizzato a gruppi paralleli, 37 uomini e 8 donne, di età compresa tra 35 e 70 anni, con diabete di tipo 2 in controllo glicemico soddisfacente con dieta o dieta + metformina sono stati assegnati ad uno dei seguenti gruppi di intervento per 8 settimane: 1. dieta ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico (gruppo CHO/fibre), 2. dieta ricca in MUFA (gruppo MUFA), 3. dieta ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico più programma di attività fisica (gruppo CHO/fibre+Ex), 4. dieta ricca in MUFA più programma di attività fisica (gruppo MUFA+Ex). Prima e dopo l'intervento è stato misurato il contenuto epatico di grasso mediante H^1 -RMN e sono stati determinati a digiuno e dopo un pasto test i lipidi nel plasma e nelle lipoproteine ricche in trigliceridi (chilomicroni+VLDL separati mediante ultracentrifugazione preparativa).

Il contenuto epatico di grasso è diminuito significativamente nei gruppi MUFA (-29%) e MUFA+Ex (-25%) rispetto ai gruppi CHO/fibre (-4%) e CHO/fibre+Ex (-6%) ($p < 0.05$, analisi della varianza a due vie), con effetto significativo per il tipo di dieta ma non per l'esercizio fisico.

L'area incrementale dei trigliceridi della frazione VLDL+chilomicroni è diminuita significativamente nel gruppo CHO/fibre (-36%) rispetto a CHO/fibre+Ex (+9%), MUFA (+30%) e MUFA+Ex (+54%) ($p < 0.05$, analisi della varianza a due vie), con effetto significativo per il tipo di dieta ma non per l'esercizio fisico.

Studio 4 In uno studio in doppio cieco cross-over 15 soggetti con diabete tipo 2 e ipercolesterolemia hanno seguito in ordine casuale un trattamento di 6 settimane con ezetimibe 10 mg + simvastatina 20 mg (EZE+S) o placebo + simvastatina 20 mg (P+S) e, dopo 6 settimane di wash-out, l'altro trattamento. Alla fine di ogni periodo sono state determinate le concentrazioni di lipidi, apoB-48 e apoB-100 nel plasma e nelle frazioni lipoproteiche (separate mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità discontinuo) prima e durante le 6 ore successive ad un pasto-test ricco in grassi. In confronto a P+S, EZE+S ha indotto: (a) una maggiore riduzione del colesterolo LDL, (b) una significativa riduzione del colesterolo dei chilomicroni sia a digiuno che dopo il pasto, (c) una significativa riduzione postprandiale dell'apoB-48 dei chilomicroni, (d) una riduzione a digiuno e in fase postprandiale del contenuto in colesterolo di VLDL, IDL e LDL, come dimostrato dalla riduzione significativa del rapporto colesterolo/trigliceridi.

Studio 5 Sedici pazienti con diabete tipo 1 in trattamento insulinico mediante microinfusore, età 36 ± 2 anni, HbA1c $7,6 \pm 0,8\%$, hanno consumato due pasti test con identica composizione in macronutrienti, ma con diverso indice glicemico: 59 o 90%. La glicemia è stata valutata prima e dopo il pasto test ogni 30 minuti per 3 ore. Nelle due occasioni è stata somministrata la stessa dose di insulina preprandiale.

La glicemia dopo il pasto a basso indice glicemico è risultata significativamente inferiore rispetto al pasto ad alto indice glicemico. L'area sotto la curva della glicemia dopo il pasto a basso indice glicemico è risultata del 20% inferiore a quella successiva al pasto ad alto indice glicemico ($p = 0,006$).

Conclusioni:

- 1) Nei pazienti con diabete tipo 2 e dislipidemia postprandiale vi è un aumento del contenuto epatico di grasso, indipendentemente da obesità e insulino-resistenza sistemica. Tale aumento del grasso epatico potrebbe essere il risultato di un'alterata

distribuzione regionale del grasso, secondaria ad una inadeguata capacità di deposito da parte del tessuto adiposo sottocutaneo.

- 2) Una dieta relativamente ricca in carboidrati, ricca in fibre e a basso indice glicemico influenza positivamente le alterazioni lipidiche postprandiali, presenti nel diabete tipo 2.
- 3) Una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi riduce il contenuto epatico di grasso nei pazienti con diabete tipo 2.
- 4) Un periodo di training aerobico associato ad un intervento variazioni qualitative della dieta non influenza né la lipemia postprandiale né il contenuto epatico di grasso in pazienti con diabete tipo 2.
- 5) L'ezetimibe influenza positivamente il profilo lipoproteico sia a digiuno che in fase postprandiale in pazienti con diabete tipo 2 favorendo la produzione di chilomicroni e VLDL poveri in colesterolo e pertanto potenzialmente meno aterogeni.
- 6) L'indice glicemico del pasto influenza positivamente la risposta glicemica in pazienti con diabete mellito tipo 1 in trattamento con microinfusore di insulina, per cui andrebbe considerato nella determinazione del dosaggio insulinico preprandiale.

INTRODUZIONE

1. Lipemia postprandiale nel diabete mellito tipo 2

La lipemia postprandiale è un processo fisiologico in virtù del quale le lipoproteine plasmatiche e le loro subfrazioni subiscono specifiche variazioni in concentrazione e composizione a seguito dell'assunzione di un pasto ed in particolare di un pasto ricco in grassi.

La maggior parte dei grassi alimentari sono rappresentati dai trigliceridi che in condizioni fisiologiche sono assorbiti pressoché completamente nell'intestino tenue, dove la lipasi pancreatica scinde il legame esterico tra acidi grassi e glicerolo. Il contenuto intestinale lipidico è emulsionato dai sali biliari e dai fosfolipidi e raccolto in micelle idrosolubili che penetrano negli enterociti per diffusione. Il glicerolo e gli acidi grassi a catena corta (con meno di 10-12 atomi di carbonio) entrano

poi nel circolo ematico e sono trasportati direttamente al fegato tramite la vena porta mentre gli acidi grassi a catena lunga sono ri-esterificati a trigliceridi e introdotti nei chilomicroni. I chilomicroni sono le lipoproteine ricche in trigliceridi di origine intestinale (esogene) cioè dei complessi macromolecolari costituiti da

una componente proteica ed una

componente lipidica. La componente proteica ha sia funzione strutturale (Apo B48) che enzimatica (Apo C, Apo E). La componente lipidica è sia idrofobica costituita prevalentemente da trigliceridi ed esteri del colesterolo che formano il core della lipoproteina, sia idrofila costituita da fosfolipidi e colesterolo che ne formano il rivestimento (Figura 1).

L'assemblamento dei chilomicroni avviene a livello dell'enterocita. Dopo l'assemblamento, i chilomicroni sono riversati nel circolo linfatico e di qui nel torrente ematico dove subiscono le modifiche strutturali che ne determinano il successivo destino metabolico. Una volta in circolo, infatti, i chilomicroni cedono parte del loro contenuto in trigliceridi e fosfolipidi alle lipoproteine ad alta densità o High Density Lipoproteins (HDL) dalle quali in cambio ricevono esteri del colesterolo ed apo C-II e apo E. L'apo C-II è l'attivatore della lipasi lipoproteica (LPL), cioè dell'enzima localizzato a livello dell'endotelio dei vasi che determina l'idrolisi della gran parte dei trigliceridi trasportati dai chilomicroni favorendone il

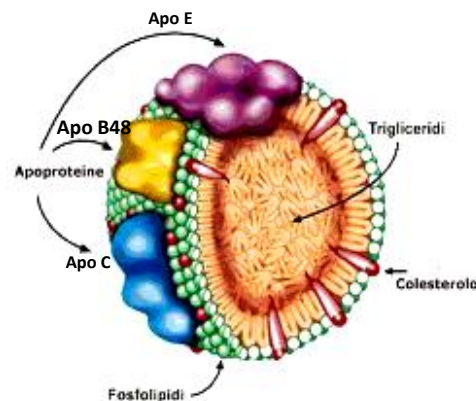


Figura 1. Struttura e composizione dei chilomicroni

deposito nel tessuto adiposo e nel muscolo. I chilomicroni così delipidizzati ad opera della LPL e dal concomitante scambio di trigliceridi, fosfolipidi ed esteri del colesterolo con le HDL si trasformano in particelle di dimensioni minori denominate remnants dei chilomicroni. I remnants dei chilomicroni sono successivamente rimossi dal circolo sanguigno ad opera del fegato mediante un recettore specifico per l'apo E (Figura 3).

A costituire il pool delle lipoproteine plasmatiche postprandiali contribuiscono anche le lipoproteine di origine endogena: le lipoproteine a densità molto bassa o Very Low Density Lipoproteins (VLDL), che sono sintetizzate dal fegato. Al pari dei chilomicroni esse sono costituite da una componente proteica strutturale (ApoB-100) e da una componente lipidica costituita per lo più da trigliceridi che vengono sintetizzati a partire dagli acidi grassi liberi derivanti dalla dieta, dalla lipolisi dei trigliceridi circolanti e di quelli depositati a livello del tessuto adiposo, dalla captazione delle lipoproteine circolanti e dalla lipogenesi de novo (Figura 2).

Una volta in circolo le VLDL subiscono lo stesso destino metabolico dei chilomicroni per cui si riduce il loro contenuto in trigliceridi per azione della LPL e degli scambi con le HDL e si trasformano in particelle di dimensioni minori che o vengono rimosse direttamente dal circolo per endocitosi mediata dal recettore che riconosce l'apo B-100 e l'apo E o vengono

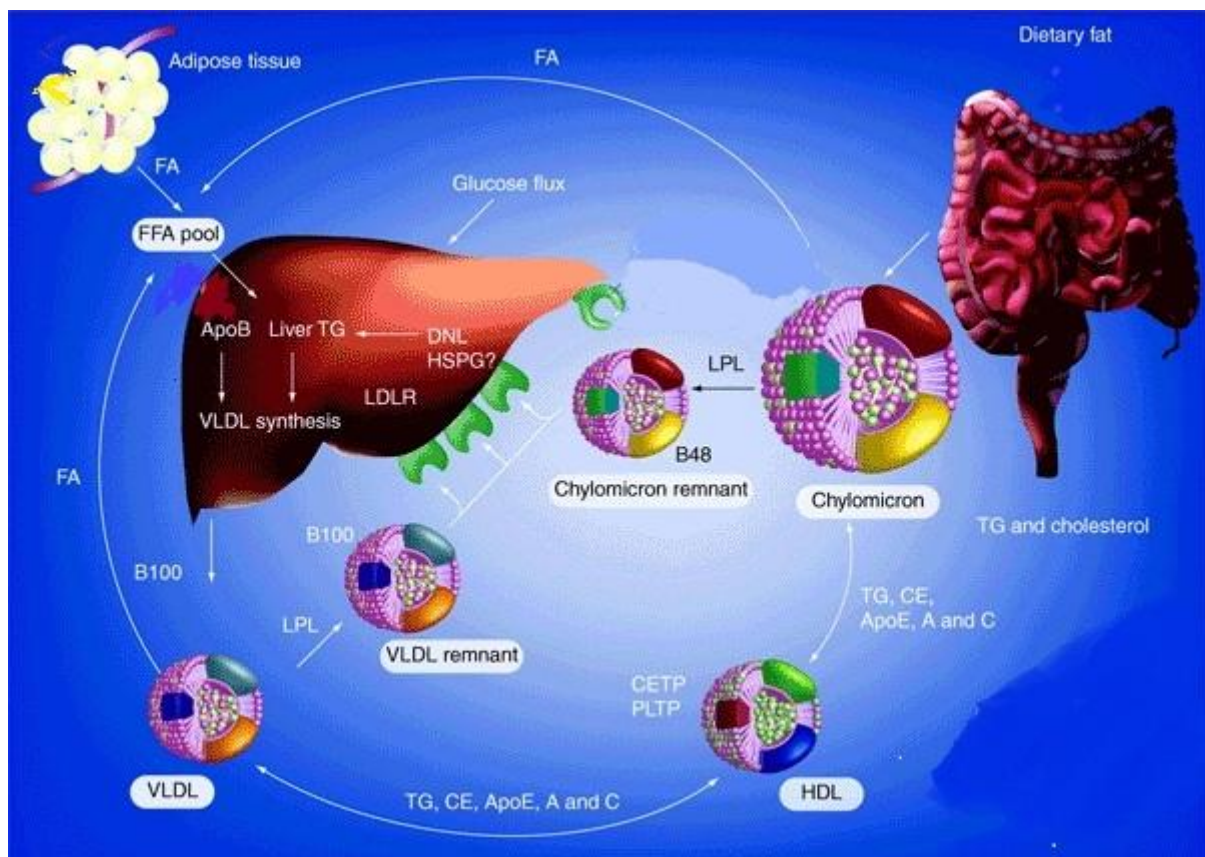


Figura 2. Metabolismo postprandiale delle lipoproteine
(Modificata da Matikainen N., *Future Lipidology* 2008)

postprandiale costituisce un fattore di rischio cardiovascolare indipendente per i pazienti con DM2 (5).

I meccanismi alla base della dislipidemia postprandiale nel DM2 non sono stati ancora completamente delucidati. Le difficoltà nella loro interpretazione risiedono soprattutto nel fatto che i fattori cui essa si associa (insulino-resistenza, iperinsulinemia, iperglicemia) sono tra loro strettamente interconnessi ed agiscono contemporaneamente ed in maniera interdipendente a diversi livelli (tessuto adiposo, fegato, intestino). Nelle sezioni che seguono si analizzeranno le evidenze scientifiche riguardanti la relazione tra alterazioni funzionali degli organi implicati nel metabolismo postprandiale delle lipoproteine (tessuto adiposo, fegato e intestino), determinanti fisiopatologici del DM2 (iperglicemia, iperinsulinemia e insulino-resistenza) e dislipidemia postprandiale (DPP).

1.1 Ruolo del tessuto adiposo

Il tessuto adiposo (TA) è l'organo deputato alla gestione dei depositi di energia dell'organismo. Fisiologicamente, in situazioni di surplus energetico- quali lo stato postprandiale- il TA immagazzina i grassi circolanti sotto forma di trigliceridi, mentre in condizioni di deficit di energia -digiuno- li idrolizza a glicerolo e acidi grassi liberi che immessi in circolo raggiungono fegato, muscoli e cuore per soddisfarne i fabbisogni. L'alternanza di immagazzinamento e rilascio in circolo di acidi grassi liberi è regolato dall'insulina.

Secondo teorie recenti (6) in condizioni di bilancio energetico positivo (disponibilità di substrati energetici superiori alle necessità) il surplus di trigliceridi che si accumulano a livello degli adipociti determina una risposta adattativa da parte del tessuto adiposo che diviene resistente all'azione anabolizzante dell'insulina (insulino-resistenza del tessuto adiposo). Ciò comporta un aumento della lipolisi anche in fase postprandiale e di conseguenza una maggiore disponibilità di substrato per la sintesi epatica di trigliceridi e la sintesi di VLDL.

1.1.1 La distribuzione del grasso addominale. L'insulino-resistenza del tessuto adiposo in condizioni di iperafflusso di lipidi è in stretta relazione con le modalità con le quali il grasso si distribuisce nei diversi distretti corporei. A tale proposito molte evidenze hanno stabilito con certezza che esiste una stretta associazione tra distribuzione centrale del grasso (cioè accumulo di adipi a livello addominale) e insulino-resistenza (IR) (7). Varie linee di ricerca sono attualmente finalizzate a definire la relazione di causalità tra distribuzione addominale del grasso e IR (8,9) e nel chiarire il contributo specifico, in questa relazione, del grasso

accumulato a livello sottocutaneo e viscerale (10-12). La maggior parte delle evidenze in proposito sono concordi nel dimostrare che il grasso viscerale è più insulino-resistente di quello sottocutaneo e pertanto in esso vi è una maggiore attività lipolitica dalla quale derivano più alti livelli plasmatici di acidi grassi liberi (13).

Inoltre, gli acidi grassi derivanti dalla lipolisi del tessuto adiposo viscerale sono immessi direttamente nel circolo portale il cui flusso ematico aumenta soprattutto in fase postprandiale (14). Da ciò deriva che in soggetti con obesità viscerale il flusso di acidi grassi liberi che in fase postprandiale arriva al fegato dal tessuto adiposo è maggiore che nei soggetti con prevalente adiposità sottocutanea (6).

In linea con queste osservazioni vari studi hanno dimostrato che un accumulo di grasso a livello viscerale si associa ad un aumento della lipemia postprandiale in soggetti obesi (15,16) e con alterata tolleranza al glucosio (17).

Evidenze recenti hanno dimostrato che pazienti con diabete mellito tipo 2 e con obesità presentano un maggior quantitativo di grasso viscerale ed intermuscolare e un minore quantitativo di tessuto adiposo sottocutaneo rispetto a pazienti obesi non diabetici (18).

L'alterata distribuzione del tessuto adiposo addominale potrebbe essere uno dei fattori fisiopatologici alla base delle alterazioni della lipemia postprandiale nel diabete mellito tipo 2. Non ci sono studi che hanno valutato specificamente le alterazioni della distribuzione del grasso corporeo in pazienti con diabete tipo 2 e con alterazioni della lipemia postprandiale.

1.1.2 La funzione paracrina ed endocrina. Parallelamente al ruolo della distribuzione del grasso addominale, nella patogenesi delle alterazioni metaboliche va anche considerata la funzione endocrina e paracrina del tessuto adiposo. Evidenze recenti dimostrano infatti che esso produce proteine ed ormoni che influenzano molteplici processi fisiologici quali il controllo dell'assunzione di cibo, l'omeostasi energetica, la sensibilità insulinica, l'angiogenesi, la regolazione della pressione arteriosa, e la coagulazione (19).

L'adiponectina è l'adipochina prodotta in concentrazioni più abbondanti dal tessuto adiposo e svolge un ruolo rilevante nell'omeostasi del glucosio e dei lipidi (20). È stato dimostrato che i livelli plasmatici di adiponectina sono ridotti in condizioni associate ad insulino-resistenza quali DM2 ed obesità (21).

Il nostro gruppo ha studiato la relazione tra adiponectina e dislipidemia postprandiale nel diabete mellito tipo 2 valutando le variazioni dei livelli plasmatici di adiponectina e della sua espressione genetica a livello del tessuto adiposo addominale sottocutaneo prima e 6 ore dopo un pasto ricco in grassi. I nostri risultati hanno evidenziato che in questa relazione il DM2

svolge un ruolo indipendente da obesità ed insulino-resistenza in quanto i pazienti con diabete ed obesità presentavano rispetto a pazienti ugualmente obesi e con lo stesso livello di insulino-resistenza ma senza diabete, livelli postprandiali di adiponectina nel plasma e dell'espressione genica nel tessuto sottocutaneo ridotti invece che aumentati. Tali variazioni correlavano inversamente con la risposta lipidemica postprandiale suggerendo che la diversa risposta al pasto dell'adiponectina, osservata nei pazienti con DM2, può contribuire al determinismo della dislipidemia postprandiale di questi pazienti (22).

Negli stessi gruppi di soggetti abbiamo anche valutato l'espressione degli endocannabinoidi a livello del tessuto adiposo addominale sottocutaneo. Il sistema degli endocannabinoidi svolge un ruolo chiave nel controllo metabolico sia a livello del sistema nervoso centrale che dei tessuti periferici. I livelli plasmatici degli endocannabinoidi sono aumentati in individui con obesità e diabete mellito tipo 2. Nel nostro studio i pazienti obesi e diabetici presentavano rispetto ai pazienti ugualmente obesi ma non diabetici livelli ridotti di endocannabinoidi nel tessuto adiposo addominale sottocutaneo. Tali livelli correlavano negativamente con l'attività tissutale della lipoprotein lipasi suggerendo che l'espressione degli endocannabinoidi nel tessuto adiposo è in grado di influenzare l'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo postprandiale delle lipoproteine (23).

1.2 Il ruolo del fegato

Il contributo diretto del fegato alle modifiche lipidemiche postprandiali consiste nella produzione delle VLDL (24). Essa è regolata innanzitutto dalla disponibilità di acidi grassi liberi (FFA), derivanti da varie fonti (lipolisi del tessuto adiposo, dieta, lipogenesi de novo, depositi citosolici di trigliceridi e lipolisi intracellulare delle lipoproteine captate direttamente dal fegato), che sono incorporati a livello epatico secondo una modalità enzima-indipendente (25,26). Dopo la captazione da parte del fegato, in base all'assetto metabolico dell'organismo, gli FFA vengono ossidati o esterificati per formare trigliceridi che a loro volta vengono immagazzinati nel citosol degli epatociti o secreti con le VLDL (6).

1.2.1 NAFLD. In condizioni non fisiologiche, quali gli stati associati ad insulino-resistenza, lo sbilanciamento dell'omeostasi epatica dei trigliceridi fa sì che essi vengano accumulati nel citosol degli epatociti determinando una condizione nota, con termine anglosassone, come Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Questo acronimo definisce un ampio spettro di condizioni anatomo-patologiche che comprendono: semplice accumulo di grasso (steatosi epatica), accumulo di grasso associato a flogosi del parenchima (steatoepatite), fibrosi, cirrosi epatica ed epatocarcinoma (27).

1.2.2 NAFLD e diabete mellito tipo 2. Diabete mellito tipo 2 e NAFLD condividono alcuni meccanismi fisiopatologici in quanto entrambi si associano ad insulino-resistenza (28-30) ed obesità (31). In virtù di questa associazione la maggior parte degli individui con diabete tipo 2 presenta anche steatosi epatica. Dati epidemiologici indicano che la percentuale di persone con diabete con un aumento del contenuto epatico di grasso è tra il 34-74 % e che quasi tutte le persone con obesità e diabete presentano steatosi epatica (32). Le attuali conoscenze scientifiche non sono in grado di definire quale sia la relazione di causa-effetto tra l'accumulo intraepatico di grasso e le alterazioni metaboliche cui esso si associa. Inoltre, il ruolo specifico del diabete indipendentemente da obesità, distribuzione del grasso addominale e insulino-resistenza nella relazione con il grasso epatico non è stato ancora ben chiarito. A questo proposito due studi recenti hanno dimostrato che persone con diabete mellito tipo 2 hanno un quantitativo maggiore di grasso epatico e grasso viscerale addominale rispetto a pazienti ugualmente obesi e non diabetici. Nel primo studio, questi risultati sono stati ottenuti mediante tomografia computerizzata, che fornisce una valutazione meno accurata del quantitativo di grasso a livello epatico e della sua distribuzione a livello addominale rispetto alle tecniche attualmente disponibili (Risonanza Magnetica e Spettroscopia di Risonanza Magnetica) (33). Nel secondo studio, gli effetti delle differenze cliniche tra pazienti con e senza diabete sono stati corretti statisticamente, lasciando qualche perplessità rispetto al ruolo indipendente del diabete (34).

1.2.3 Grasso epatico e lipemia postprandiale. Il ruolo della NAFLD nelle alterazioni della lipemia postprandiale del DM2 è suggerito dalla forte associazione con tali alterazioni.

E' stata osservata una stretta correlazione tra ipertrigliceridemia a digiuno, bassi livelli di HDL, preponderanza di LDL piccole e dense (caratteristiche della dislipidemia diabetica) e

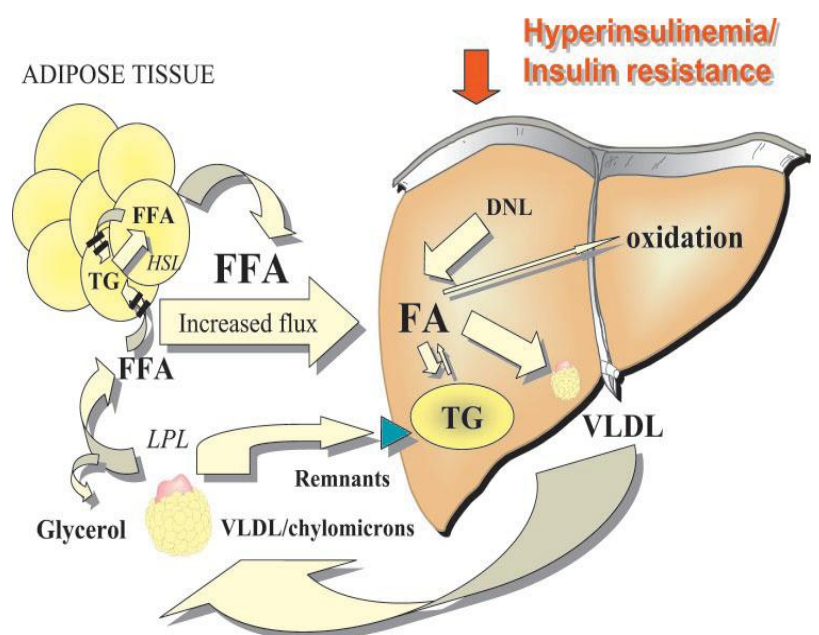


Figura 4. Associazione tra lipemia postprandiale, insulino-resistenza e steatosi epatica (24)

contenuto epatico di grasso (32,33,35,36). In altri studi il grasso epatico era il migliore predittore della iperproduzione di VLDL grandi propria dei pazienti con DM2 (37). Altre evidenze hanno anche dimostrato che l'entità delle alterazioni quali-quantitative della lipemia postprandiale del DM2 è correlata con il quantitativo epatico di grasso (38). La relazione di causa-effetto tra anomalie lipidiche nel DM2 e l'accumulo di grasso nel fegato non è stata completamente chiarita. Una possibile spiegazione è che in presenza di insulino-resistenza si determina una condizione di iperafflusso di substrati (glucosio, FFA) al fegato. L'assetto omeostatico del metabolismo epatico risponde aumentando la sintesi e la secrezione delle VLDL in modo da smaltire i substrati in eccesso.

È possibile che questa iperproduzione non sia tuttavia sufficiente a controbilanciare il surplus di substrati per cui la quota di acidi grassi liberi che non possono essere smaltiti si accumulano a livello degli epatociti (39) (Figura 4) .

1.3 Il ruolo dell'intestino

È ormai ben noto che in condizioni associate ad insulino-resistenza quali il DM2 vi è un aumento delle lipoproteine circolanti di origine intestinale sia a digiuno che in fase postprandiale (40,41). Il meccanismo mediante il quale in condizioni di insulino-resistenza si verifica questo aumento non è stato ancora ben chiarito. Allo stato attuale, gli studi sull'argomento sono stati focalizzati sull'alterata eliminazione dal circolo sia dei chilomicroni che dei loro remnants. Non è stato completamente chiarito se in condizioni di insulino-resistenza vi sia anche un aumento della produzione delle particelle ricche in trigliceridi di origine intestinale. Indicazioni in tal senso derivano soprattutto da studi in animali secondo i quali un'alterazione della insulino-sensibilità determinerebbe un'aumentata produzione di apo B48(42). Studi di cinetica nell'uomo sembrano confermare questo dato in pazienti con DM2 (43). Fra i possibili meccanismi con cui si realizza l'aumento della produzione di lipoproteine di origine intestinale nei pazienti con DM2, vi è un maggiore assorbimento di colesterolo, rispetto ai soggetti sani, che rappresenterebbe di per sé uno stimolo per la maggior produzione di lipoproteine contenenti apo B48 (44,45).

2. Glicemia postprandiale nel diabete tipo 1

Il diabete mellito tipo 1 è una patologia autoimmune che determina la distruzione delle cellule beta del pancreas da cui consegue la carenza assoluta di insulina. Pertanto, il paziente affetto da DM1 necessita della somministrazione di insulina esogena per la sopravvivenza. Nel corso degli ultimi decenni, grazie alla formulazione di insuline modificate e all'utilizzo di strumenti tecnologici le modalità di somministrazione dell'insulina mimano sempre di più le

condizioni fisiologiche. Ciononostante l'assoluta ottimizzazione del compenso glicemico è ancora un obiettivo da raggiungere. Una delle difficoltà maggiori al raggiungimento di questo obiettivo è rappresentato dalla variabilità della risposta glicemica al pasto. L'inadeguatezza della dose di insulina preprandiale legata all'imprevedibilità della risposta glicemica può determinare l'insorgenza di ipo e/o iperglicemie che oltre ad essere di per sé rischiose contribuiscono al determinismo della variabilità glicemica. La variabilità glicemica, insieme all'iperglicemia protratta, svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo delle complicanze ed è una condizione fortemente invalidante per il paziente.

2.1 Il ruolo della terapia insulinica

In condizioni fisiologiche la secrezione di insulina in risposta ad un pasto avviene secondo una modalità bifasica composta da un picco precoce (15 minuti) ed una fase tardiva (3-4 ore) di secrezione la cui entità e durata sono regolate da vari fattori il principale dei quali è la glicemia. Infatti, non appena la glicemia comincia a calare, la secrezione insulinica diminuisce rapidamente e torna a valori simili a quelli del digiuno dopo 2-3 ore dall'ingestione del pasto per rimanere piatta, nel digiuno notturno (46) (Figura 5).

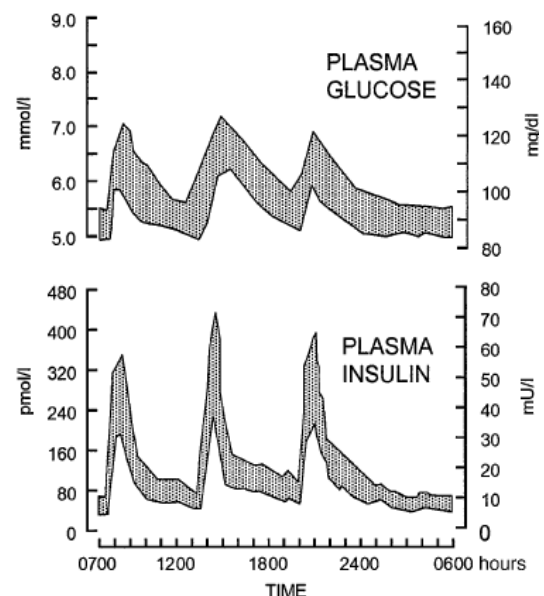


Figura 5. Secrezione fisiologica di insulina (46).

Nei pazienti con DM1 la terapia insulinica ottimale dovrebbe mimare quanto più fedelmente possibile questa modalità di funzionamento mediante uno schema di somministrazione che sia in grado di ricreare un picco precoce postprandiale ed un'insulinemia piatta nelle fasi interprandiali. Questo scopo è oggi raggiunto mediante l'utilizzo combinato di analoghi dell'insulina umana ad azione ultrarapida e lenta (schema basal bolus) o del microinfusore di insulina.

Gli analoghi ad azione rapida dimostrano una maggiore velocità di assorbimento generando un picco insulinemico più precoce ed elevato ed hanno una minore durata d'azione rispetto all'insulina umana regolare. Gli analoghi ad azione lenta hanno un profilo piatto (senza picchi) e una durata d'azione di circa 24 h (47).

Il microinfusore è una pompa tascabile che eroga insulina secondo una modalità di infusione basale che determina i livelli di insulinemia interprandiali e secondo una modalità bolo che consente di riprodurre i picchi di secrezione insulinica preprandiali.

Il microinfusore, quindi, eroga costantemente piccole quantità di insulina ultrarapida che vengono immediatamente assorbite senza costituire depositi sottocutanei. Ciò consente la razionalizzazione delle dosi di insulina ed un ulteriore avvicinamento dello schema terapeutico alla modalità fisiologica di secrezione insulinica. Il microinfusore consente inoltre la somministrazione di boli preprandiali con diversi profili e velocità che consentono di adattare i tempi di immissione in circolo dell'insulina alle modalità di assorbimento del pasto (48).

Il limite principale della terapia insulinica moderna è che, per quanto flessibile, essa è ancora molto lontana dal riuscire a regolare l'azione delle innumerevoli variabili che determinano la risposta glicemica postprandiale. Molte di queste variabili sono probabilmente ancora sconosciute mentre di altre non si riesce ancora a prevedere esattamente le modalità di funzionamento. Tra queste ultime vi è la composizione del pasto.

2.2 La composizione del pasto

Il contenuto in carboidrati del pasto è il principale determinante della risposta glicemica postprandiale. In pazienti con diabete mellito tipo 1, un aumento del consumo giornaliero di carboidrati, in particolare di amido, di circa 100 g al giorno, senza alcuna variazione dell'introito di fibre alimentari determina un peggioramento significativo del controllo glicemico con aumento sia della variabilità glicemica che della glicemia media giornaliera. Quest'ultimo aumento è dovuto principalmente ad un incremento significativo della glicemia postprandiale (circa 100 mg/dL in più dopo pranzo e cena) (49).

L'aumento della glicemia postprandiale in seguito all'assunzione di un pasto ricco in carboidrati è controbilanciato dall'aumento delle dosi preprandiali di insulina (50). Proprio sulla base della stretta relazione tra dose preprandiale di insulina e risposta glicemica postprandiale si sono diffusi nella pratica clinica l'utilizzo

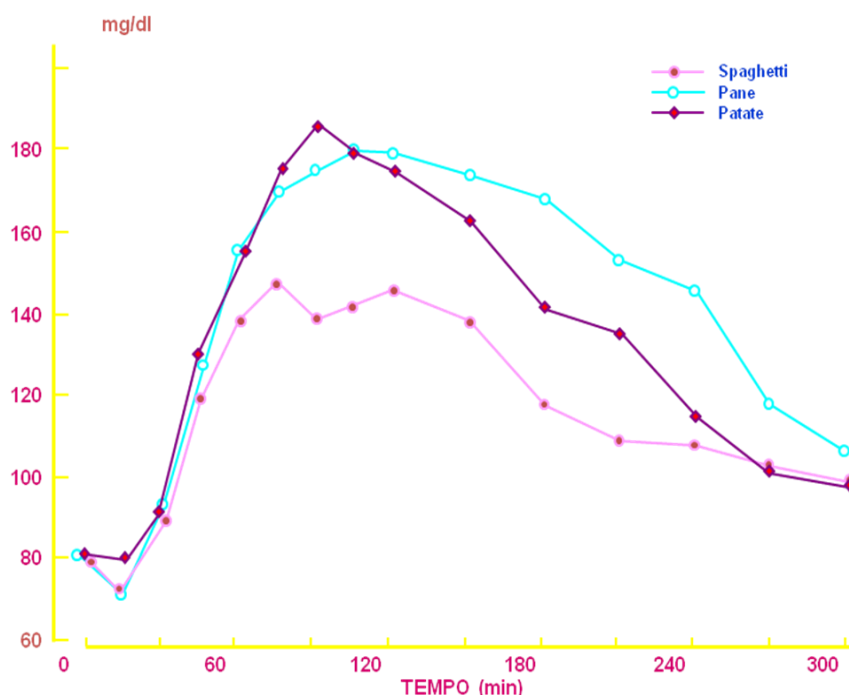


Figura 6. Andamento temporale della glicemia dopo l'assunzione di pasti con identico contenuto in carboidrati e diverso indice glicemico

della “lista di scambi dei carboidrati” e degli algoritmi di adeguamento della dose di insulina alla variazione dei carboidrati nel pasto. Tali algoritmi sono estremamente individualizzati e tengono conto sia della sensibilità insulinica (rapporto che esprime la riduzione della glicemia in mg/dl determinata da 1 U.I di insulina) che del rapporto insulina carboidrati (quantità di carboidrati in grammi “smaltiti” da 1 unità di insulina) del singolo paziente nei vari momenti della giornata (51). Allo stato attuale gli algoritmi di aggiustamento delle dosi preprandiali di insulina non tengono conto di variabili della composizione del pasto che influenzano la risposta glicemica postprandiale. Tra queste vi è il contenuto in grassi (52) e proteine (53) del pasto ma soprattutto la qualità dei carboidrati. I carboidrati, infatti, costituiscono una famiglia molto eterogenea con spiccata differenza nella velocità e nell’entità dell’assorbimento e della digestione che si traducono, in vivo, in risposte glicemiche sostanzialmente differenti tra di loro (Figura 6). I fattori che influenzano la digestione e l’assorbimento dei CHO disponibili (digeriti ed assorbiti dall’intestino dell’uomo) sono molteplici: diverso contenuto in amilosio ed amilopectina dell’amido, presenza di fitati, antinutrienti e fibre alimentari e stato fisico dell’alimento. Per l’insieme di tali fattori due alimenti contenenti la stessa quantità di carboidrati disponibili ma con differente composizione non determinano la stessa risposta glicemica. Tale differenza è espressa con il concetto teorico di indice glicemico che indica le modalità di incremento della glicemia rispetto al tempo (Figura 6), e si esprime calcolando il rapporto percentuale tra risposta glicemica di un determinato alimento e risposta glicemica di un alimento di riferimento (pane o glucosio) a parità di quantità di carboidrati. Da un punto di vista pratico si possono individuare almeno tre gruppi di alimenti: alimenti a indice glicemico

IG ALTO		IG MEDIO		IG BASSO	
Patate	85	Uva	49	Fagioli	33
Pizza	80	Succo di arance	46	Lenticchie	33
Polenta	79	Arance	42	Ceci	42
Pane tostato	73	Mela	38	Piselli	22
Pane	70				
Riso	64				

Figura 7. Alimenti a indice glicemico (IG) alto medio e basso in riferimento al glucosio
alto, intermedio e basso (Figura 7).

Gli alimenti a basso indice glicemico determinano un’area sotto la curva della glicemia postprandiale minore di quella degli alimenti ad alto indice glicemico in quanto determinano un picco minore e/o determinano un aumento della glicemia più prolungato nel tempo.

3. Strategie terapeutiche della dislipidemia postprandiale

La dislipidemia postprandiale è una condizione di rilevanza clinica in quanto essa è associata, indipendentemente, ad un aumento del rischio cardiovascolare. Ciò è dimostrato da studi che hanno confrontato la risposta lipemica postprandiale di pazienti con diverse forme cliniche di aterosclerosi con quella di soggetti di controllo senza vasculopatia, mediante la valutazione del grado di ostruzione coronarica (54,55) e della presenza di arteriopatia periferica (56-58) ma anche di indicatori precoci di coinvolgimento vascolare quali lo spessore medio-intimale carotideo (59-61). Attualmente mancano, studi di intervento che abbiano valutato gli effetti della correzione delle alterazioni lipidiche in fase postprandiale sul rischio cardiovascolare ma, soprattutto, non è ancora noto quale approccio terapeutico sia efficace nel correggere tali alterazioni sia direttamente, sia mediante effetti su altre condizioni fisiopatologiche che sono in stretta associazione con la dislipidemia postprandiale quali l'accumulo di grasso a livello epatico.

Data l'estrema importanza della modifica dello stile di vita per il trattamento del diabete è molto probabile che sia interventi nutrizionali mirati che l'attività fisica possano influenzare anche la dislipidemia postprandiale e la steatosi epatica.

Di seguito sarà riportata una sintesi delle evidenze a disposizione sia sugli effetti della dieta e dell'attività fisica su dislipemia postprandiale (DPP) e steatosi epatica. Si accennerà inoltre ad una possibile strategia farmacologica per la DPP.

3.1 La dieta

3.1.1 Effetti della dieta sulla lipemia postprandiale. L'influenza di diversi interventi nutrizionali sulla concentrazione plasmatica dei lipidi in fase postprandiale è stata sinora studiata per lo più in acuto più che con interventi dietetici veri e propri.

Gli studi in acuto che hanno confrontato l'effetto di diversi tipi di acidi grassi hanno mostrato una riduzione della lipemia postprandiale con pasti ricchi in acidi grassi polinsaturi n-3 rispetto ad altri tipi di acidi grassi (62). Altri studi, che hanno confrontato gli effetti acuti di pasti ricchi in PUFA n-6 rispetto a pasti ricchi in MUFA (acido oleico, n-9), hanno mostrato o una più bassa risposta lipidica postprandiale con PUFA n-6 o, più spesso, un'uguale risposta (63,64).

Controversi sono anche i dati degli studi che hanno valutato l'effetto di pasti ricchi in MUFA, PUFA n-3 o n-6, o di acidi grassi saturi (SAFA) (65) e che hanno dato risultati talvolta a favore (66) degli acidi grassi monoinsaturi, talvolta a favore dei SAFA (67).

I dati che derivano da studi a medio termine riguardano soprattutto gli effetti degli acidi grassi polinsaturi omega-3. A questo proposito, Weintraub (68) e collaboratori hanno dimostrato una riduzione della lipemia postprandiale del 36 e del 47%, rispettivamente, in seguito alla somministrazione a soggetti sani di diete ricche in PUFA n-6 o n-3.

La riduzione dei trigliceridi postprandiali ad opera dei PUFA è stata confermata anche in uno studio più a lungo termine (3 mesi) effettuato in individui sani con un supplemento di 2.7 g/die di acidi grassi n-3(69).

Se l'effetto ipotrigliceridemizzante anche in fase postprandiale degli acidi grassi polinsaturi, in particolare della serie n-3, è abbastanza chiaro, gli effetti di diete ricche in acidi grassi monoinsaturi nei confronti di diete ricche in acidi grassi saturi sulla lipemia postprandiale e sui possibili meccanismi che la regolano sono ancora molto poco studiati. A tal proposito, mancano completamente studi su queste problematiche effettuati in pazienti diabetici, che invece, potrebbero trarne maggiori benefici, considerando che le alterazioni lipidiche postprandiali sono tipiche di questa patologia (70). Un altro aspetto interessante, in particolare nei pazienti con diabete di tipo 2, è quello riguardante lo studio dell'effetto di diete ricche in MUFA rispetto a diete ricche in carboidrati (CHO) nel modulare l'entità della lipemia postprandiale. La dislipidemia diabetica, infatti, è caratterizzata da ipertrigliceridemia e questa alterazione sembrerebbe essere esacerbata da diete ad alto contenuto in carboidrati, i quali, se assunti cronicamente in eccessiva quantità (soprattutto se si tratta di saccarosio e di fruttosio) (71) possono indurre un'eccessiva formazione di VLDL da parte del fegato e quindi ipertrigliceridemia (72). In queste condizioni potrebbe essere aumentata anche la risposta lipemica postprandiale (73). Ma ancora una volta, i pochi dati provenienti da studi clinici controllati sono estremamente contraddittori. Infatti, in due lavori che hanno valutato diete isoenergetiche a diverso contenuto in acidi grassi monoinsaturi e carboidrati non si sono avute differenze nella risposta postprandiale tra le due diete (74,75). Invece, in uno studio di tipo cross-over effettuato in pazienti con diabete tipo 1, la dieta ad alto contenuto in MUFA (40% di energia proveniente dai grassi, in predominanza MUFA) ha determinato una più ampia risposta lipidica postprandiale rispetto ad una dieta ricca in CHO (25% di grassi e 61% di CHO) (76). Infine Georgopoulos et coll. hanno mostrato che diete ad alto contenuto in carboidrati, rispetto a diete ricche in grassi, amplificano l'entità della lipemia postprandiale in individui sani (77).

I possibili effetti negativi dell'alto consumo di CHO sulla trigliceridemia a digiuno e probabilmente su quella postprandiale, osservati in alcuni studi, potrebbero essere evitati se

gli alimenti ricchi in carboidrati utilizzati fossero anche ricchi in fibre e/o con basso indice glicemico, come è già stato dimostrato per quanto riguarda gli effetti sui lipidi a digiuno. Le fibre alimentari hanno diversi effetti sull'assorbimento dei grassi e del colesterolo a livello intestinale e quindi possono influenzare il metabolismo lipidico postprandiale tramite diversi meccanismi (78). Infatti, in modelli animali ed umani, le fibre alimentari si sono mostrate capaci di ritardare lo svuotamento gastrico, rallentare o ridurre la digestione e l'assorbimento dei grassi e del colesterolo della dieta, promuovere l'eliminazione di acidi biliari e steroli ed aumentare la produzione di acidi grassi volatili a catena corta (79-83). Esse, quindi, sono dotate di un ben documentato effetto ipocolesterolemizzante. Infatti, pasti ricchi in fibra riducevano il contenuto di colesterolo dei chilomicroni e delle LDL nello stato postprandiale, anche se i cambiamenti sui livelli di trigliceridi postprandiali si sono mostrati di entità minore, ma comunque statisticamente significativi (84-86). Gli effetti di una dieta ricca in carboidrati, ricca in fibre e con alimenti a basso indice glicemico sul metabolismo lipidico in fase postprandiale sono a tutt'oggi completamente sconosciuti, in particolare per quanto riguarda i pazienti con diabete tipo 2.

3.1.2 Effetti della dieta sul grasso epatico. Gli effetti della dieta sul grasso epatico sono, se possibile, ancora più scarsi di quelli disponibili sulla lipemia postprandiale. Sino ad ora la maggior parte degli studi che ha valutato l'effetto di interventi nutrizionali sulla steatosi epatica ha studiato diete a basso contenuto calorico cui si associava una riduzione ponderale (87,88). Sino ad ora un solo studio di intervento a breve termine (3 settimane) ha analizzato gli effetti di modifiche estreme della composizione della dieta, in assenza di perdita di peso. In questo studio una dieta ricca in carboidrati e povera in grassi rispetto ad una dieta molto ricca in grassi (56%) e povera in carboidrati riduceva il quantitativo epatico di grasso di circa il 20% in donne in sovrappeso (89).

Nell'uomo, solo studi osservazionali hanno sinora valutato l'impatto della qualità sia degli acidi grassi che dei carboidrati sulla steatosi epatica. In questi studi un consumo alto di grassi saturi e basso di omega-3 era associato ad una maggiore prevalenza di steatosi epatica. Non ci sono studi che hanno valutato gli effetti degli acidi grassi monoinsaturi (90).

Riguardo alla relazione tra qualità dei carboidrati e steatosi epatica un solo studio trasversale condotto in Emilia Romagna ha evidenziato una relazione tra indice glicemico della dieta e prevalenza della steatosi epatica evidenziando che il consumo di cibi ad alto indice glicemico si associava ad un più alto grado di steatosi epatica (91).

3.2 L'attività fisica

3.2.1 Effetti dell'attività fisica sulla lipemia postprandiale. I dati sugli effetti dell'attività fisica sulla lipemia postprandiale derivano soprattutto da studi in acuto. In questi studi è stato considerato l'effetto di un'unica sessione di attività aerobica effettuata prima (la sera precedente o un'ora prima) dell'esecuzione di un pasto test (92,93). Anche in questo caso i dati sono contraddittori in quanto alcuni autori hanno riscontrato la riduzione del numero ed il miglioramento della composizione delle VLDL mentre altri non hanno osservato effetti significativi né sulle lipoproteine endogene né su quelle esogene. Due studi in acuto sono stati condotti in pazienti con diabete mellito tipo 2; di questi, uno ha valutato gli effetti dell'attività fisica effettuata prima di un pasto grasso giungendo a conclusioni non univoche (94) mentre l'altro ha valutato gli effetti dell'attività fisica svolta dopo il pasto (95) mostrando una riduzione dei livelli di trigliceridi postprandiali sia delle VLDL che dei chilomicroni.

Studi in cronico in soggetti sani allenati mostrano che la sospensione dell'allenamento peggiora la risposta lipidica postprandiale (96) e un altro studio ha mostrato che anche in soggetti con un buon grado di allenamento i benefici dell'attività fisica sulla lipemia postprandiale si esauriscono dopo 60h dallo svolgimento dell'ultima sessione di attività fisica (97).

Nell'unico studio in cronico effettuato in pazienti con diabete mellito tipo 2 un periodo di allenamento aerobico supervisionato con frequenza tri-settimanale e all'intensità del 70% della VO₂ Max ha determinato una ridotta secrezione delle VLDL (98).

3.2.1 Effetti dell'attività fisica sul grasso epatico. L'attività fisica con concomitante riduzione ponderale da sola o in associazione alla restrizione calorica si è dimostrata efficace nella riduzione del grasso epatico sia in studi osservazionali che di intervento sia in pazienti con che senza diabete (99).

Recentemente è stato anche riportato che in soggetti obesi senza diabete un programma di attività fisica aerobica ha ridotto il grasso intraepatico indipendentemente dalla perdita di peso (100).

Dati sugli effetti dell'attività fisica sul grasso epatico indipendenti dal calo ponderale mancano in pazienti con diabete tipo 2 e non è noto se e che tipo di interazione vi sia tra attività fisica e modifiche qualitative della dieta.

3.3 I farmaci

I farmaci comunemente utilizzati per trattare le iperlipidemie sembrano essere in grado di ridurre la concentrazione delle lipoproteine ricche in trigliceridi e dei loro remnant presenti

nella fase postprandiale. Diversi studi hanno valutato gli effetti dei fibrati dimostrando che le varie molecole (101,102) sono in grado di ridurre la concentrazione delle lipoproteine ricche in trigliceridi sia di origine epatica che intestinale (102,103) o prevalentemente epatica (104) in pazienti iperlipidemici sia con (102,103) che senza (101,104) diabete.

Il meccanismo ipotizzato alla base di questi risultati sarebbe la capacità dei fibrati di ridurre i livelli di trigliceridi di origine endogena con una conseguente minore competizione fra particelle di origine endogena ed esogena a livello della rimozione epatica recettore-mediata. Il trattamento con bezafibrato sembra essere in grado anche di ripristinare i normali livelli di efflusso del colesterolo dalle cellule sia a digiuno sia in fase postprandiale migliorando il trasporto inverso del colesterolo, meccanismo, quest'ultimo, che in pazienti insulinoresistenti è alterato a causa del rallentamento della lipolisi postprandiale delle lipoproteine ricche in trigliceridi (105).

Diversi studi hanno valutato gli effetti delle statine sulla lipemia postprandiale dimostrandone gli effetti benefici in pazienti con diabete tipo 2 (106), con alterata glicemia a digiuno (107) ed iperlipidemia mista (108). In questi studi, infatti, sia la simvastatina (106) che la atorvastatina da sola (107) ed in associazione ad acidi grassi omega-3 (108) hanno ridotto la trigliceridemia postprandiale.

Alcuni studi hanno confrontato gli effetti postprandiali delle statine con quelli dei fibrati. In uno studio che ha confrontato gemfibrozil e lovastatina in pazienti con ipoalfalipoproteinemia e ipertrigliceridemia lieve/moderata il gemfibrozil si è mostrato più efficace della lovastatina nel ridurre la lipemia postprandiale (109).

Recentemente ai farmaci ipolipemizzanti si è aggiunto l'ezetimibe un farmaco che agisce inibendo selettivamente i trasportatori coinvolti nell'assorbimento intestinale del colesterolo, e in particolare la Niemann-Pick C1-Like 1 Protein (NPC1L1)(111).

L'ezetimibe è indicato nel trattamento dell'ipercolesterolemia sia in associazione con altri farmaci ipolipemizzanti (nei pazienti che non raggiungono, con questi da soli, gli obiettivi terapeutici) sia in monoterapia nei pazienti intolleranti alle statine.

In particolare, l'utilizzo dell'Ezetimibe in associazione con le statine sembra in grado di potenziare l'effetto ipolipidemizzante di entrambi; ciò è dovuto al fatto che i due farmaci agiscono sinergicamente. Infatti, per una risposta omeostatica dell'organismo, l'inibizione della sintesi epatocitaria del colesterolo da parte delle

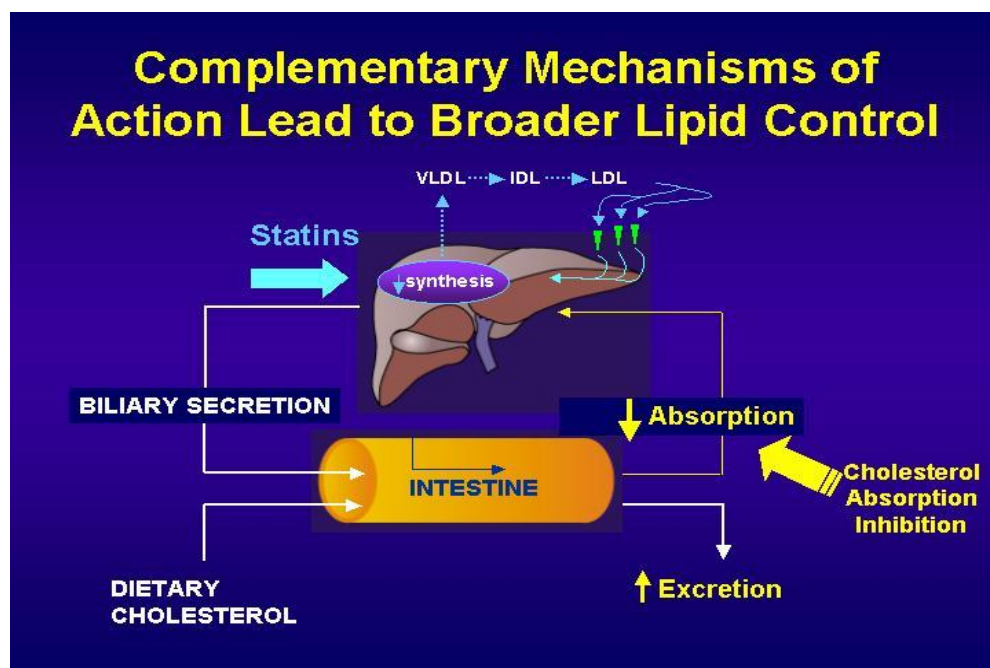


Figura 9. Meccansimo d'azione sinergico di ezetimibe+statina
(da www.sisalombardia.it)

statine, ne determina un aumento dell'assorbimento intestinale; viceversa la monoterapia con Ezetimibe, diminuendo l'assorbimento del colesterolo, ne aumenta la sintesi endogena (figura 9). Quindi, la combinazione Ezetimibe-Statina attenua i meccanismi omeostatici di compenso della monoterapia. L'utilizzo dell'associazione, inoltre, riduce la tossicità dei singoli farmaci poiché consente di ridurre le dosi.

Numerosi studi hanno dimostrato che sia l'ezetimibe da sola che l'associazione ezetimibe-statina sono in grado di ridurre il colesterolo LDL (112). Non sono noti gli effetti dell'ezetimibe sulla lipemia postprandiale. In virtù del suo meccanismo d'azione l'ezetimibe potrebbe essere particolarmente efficace nel miglioramento di alcune alterazioni della lipemia postprandiale tipiche del DM2 quali appunto la formazione di remnants dei chilomicroni ricchi in colesterolo. Ciò si verificherebbe sia per la riduzione dell'assorbimento intestinale di per sé sia per la conseguente ridotta disponibilità del colesterolo per la sintesi delle VLDL.

4. Correzione dell'iperglicemia postprandiale

Il DCCT ha dimostrato chiaramente che l'ottimizzazione del compenso glicemico è fondamentale per la prevenzione delle complicanze (113).

Tale ottimizzazione del controllo glicemico include il controllo della glicemia postprandiale e quindi l'adeguamento della terapia insulinica alla composizione del pasto. Il DCCT ha anche dimostrato che i pazienti che adeguano la dose di insulina al quantitativo di carboidrati del

pasto raggiungono un compenso migliore (114). Benché sia noto che la qualità dei carboidrati influenzi la risposta glicemica ad un alimento indipendentemente dalla quantità, non esistono ad oggi programmi educazionali o algoritmi di correzione della dose di insulina preprandiale che tengano conto dell'indice glicemico degli alimenti.

4.1 Ruolo dell'indice glicemico degli alimenti

Vari trials randomizzati e controllati hanno riportato dei miglioramenti significativi del HbA1c e della glicemia postprandiale in pazienti con diabete mellito tipo 1 che seguivano una dieta a basso indice glicemico (115,116). In particolare, una metanalisi di Brand-Miller riporta una riduzione di HbA1c del 10 % (117). Studi recenti hanno anche valutato mediante monitoraggio in continuo della glicemia gli effetti dell'indice glicemico degli alimenti sulla variabilità glicemica intragiornaliera dimostrando che un'alimentazione con basso indice glicemico si associa ad un minor numero di oscillazioni glicemiche (118,119).

Ryan e coll.(120) hanno valutato gli effetti di schemi insulinici diversi sulla risposta postprandiale a pasti con indice glicemico differente. In particolare essi hanno confrontato l'ampiezza delle escursioni postprandiali, misurate mediante monitoraggio in continuo della glicemia, dopo l'assunzione di un pasto a basso indice glicemico preceduto dalla somministrazione preprandiale una volta di analogo ultrarapido, un'altra di insulina regolare (che ha un picco d'azione più tardivo e una durata maggiore dell'analogo) e in un'altra occasione ancora hanno effettuato un somministrazione postprandiale di analogo ultrarapido. La somministrazione preprandiale di analogo ultrarapido si è dimostrato la modalità più efficace per la riduzione delle escursioni glicemiche postprandiali.

Al momento non esistono studi che abbiano valutato l'effetto di pasti con diverso indice glicemico sulla risposta postprandiale in pazienti in terapia con microinfusore di insulina. La razionalizzazione della somministrazione insulinica che si ottiene con questa modalità di erogazione della terapia consente di "isolare" più precisamente l'effetto del bolo preprandiale, permettendo di elaborare algoritmi per il calcolo del bolo insulinico che tengano anche conto dell'indice glicemico degli alimenti in maniera più precisa.

OBIETTIVI

1. Obiettivi generali

Il diabete mellito tipo 2 e tipo 1 si associa ad alterazioni del metabolismo postprandiale che costituiscono un fattore di rischio per lo sviluppo di malattia cardiovascolare e complicanze

microvascolari. Di conseguenza, la comprensione dei meccanismi alla base di queste alterazioni e la loro correzione sono di fondamentale importanza clinica.

Pertanto, gli obiettivi generali della linea di ricerca seguita durante il dottorato sono stati:

- 1) Chiarire i meccanismi fisiopatologici delle alterazioni postprandiali che si associano al diabete
- 2) Studiare l'impiego di possibili strategie terapeutiche.

2. Obiettivi specifici

L'alterazione del metabolismo postprandiale caratteristica del DM2 è la dislipidemia postprandiale (LPP). I meccanismi che la determinano sono molto complessi e coinvolgono vari organi e tessuti (tessuto adiposo, fegato, intestino e muscolo). Fra gli aspetti non ancora chiariti nella relazione tra DM2 e alterazioni della lipemia postprandiale vi sono il ruolo fisiopatologico dell'alterata distribuzione del tessuto adiposo addominale e dell'accumulo di grasso a livello epatico.

Per quanto riguarda le possibili strategie terapeutiche esse includono la dieta, l'attività fisica e un nuovi farmaci ipocolesterolemizzante. Tali strategie potrebbero agire sia direttamente sia influenzando altre condizioni patologiche associate alla LPP, quali la steatosi epatica.

A tale proposito non è noto se variazioni qualitative della dieta efficaci per la cura del diabete influenzino anche la LPP o l'accumulo di grasso epatico. Non è stato mai dimostrato, inoltre, se un programma di attività fisica aerobica (efficace nel miglioramento del compenso glicemico), da solo o in associazione a modifiche isocaloriche della dieta sia in grado, indipendentemente dalla modifica di peso di migliorare la LPP e/o la steatosi epatica.

Non sono noti, in pazienti con DM2, gli effetti dell'ezetimibe, un farmaco inibitore dell'assorbimento intestinale di colesterolo, sulla LPP.

Per quanto riguarda le alterazioni del metabolismo postprandiale nel diabete mellito tipo 1 esse consistono essenzialmente nelle alterazioni dei livelli di glicemia. L'ottimizzazione della terapia insulinica è, al momento, l'unica strategia possibile per attenuare tali alterazioni. Una delle tappe limitanti a questa ottimizzazione è la difficoltà di adeguare la modalità di somministrazione di insulina preprandiale alla composizione del pasto. In particolare non è noto come due pasti con differente indice glicemico, ma uguale contenuto in carboidrati influenzino la risposta glicemica postprandiale in pazienti con diabete mellito tipo 1 in terapia con microinfusore di insulina.

Pertanto, al fine di chiarire queste problematiche, **gli obiettivi specifici** della linea di ricerca seguita durante il dottorato sono stati:

- 1) Studiare la relazione tra diabete mellito tipo 2, contenuto epatico di grasso e distribuzione del grasso addominale indipendentemente da obesità ed insulino-resistenza. (**Studio 1** pubblicato su European Journal of Clinical Investigation, 2011)
- 2) Valutare gli effetti sulla dislipidemia postprandiale e sul grasso epatico di due diete isocaloriche -una ricca in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e una ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico (CHO/fibre)- (**Studio 2** pubblicato su Diabetes Care 2009, e **Studio 3** sottomesso alla rivista Diabetes Care).
- 3) Valutare gli effetti sulla steatosi epatica e sulla dislipidemia postprandiale , di un programma di attività fisica aerobica da solo o in associazione ad una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e una ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico (CHO/fibre), indipendentemente dal calo ponderale (**Studio 3** sottomesso alla rivista Diabetes Care) .
- 4) Studiare gli effetti sulla lipemia postprandiale di un trattamento di 6 settimane con l'associazione simvastatina+ezetimibe (**Studio 4** pubblicato su Atherosclerosis, 2011)
- 5) Studiare gli effetti dell'indice glicemico del pasto sulla risposta glicemica postprandiale in pazienti con diabete mellito tipo 1 in trattamento con microinfusore di insulina (**Studio 5** pubblicato su Diabetic Medicine, 2010).

I risultati principali degli studi che sono stati portati a termine per raggiungere tali obiettivi saranno riportati nei capitoli successivi. In appendice saranno anche riportate *in extenso* le relative pubblicazioni. Poiché le principali metodologie utilizzate per la valutazione della lipemia postprandiale e la valutazione del contenuto epatico di grasso sono comuni in questi studi, esse vengono riportate una sola volta, prima della descrizione degli stessi.

METODI

1. Valutazione della lipemia postprandiale

Come illustrato nella tabella 1 esistono diversi metodi per lo studio della lipemia postprandiale (121). L'obiettivo metodologico è la precisa caratterizzazione e quantificazione delle lipoproteine ricche in trigliceridi che si formano nel periodo postprandiale. L'esatta differenziazione delle particelle per quanto riguarda la loro composizione lipidica e la loro origine epatica o intestinale, è di difficile esecuzione in quanto le metodiche attualmente disponibili sono complesse e costose. D'altra parte, la semplice determinazione della trigliceridemia postprandiale, possibile mediante l'uso, anche domiciliare, di riflettometri portatili, può fornire indicazioni utili per l'individuazione e la correzione della condizione di iperlipidemia postprandiale (122-124).

L'ultracentrifugazione è una metodologia molto complessa che permette di separare le lipoproteine in base alla loro densità e quindi in base al loro coefficiente di flottazione Sf. Esistono varie tecniche di ultracentrifugazione (analitica, preparativa in densità di solvente e in gradiente di densità, zonale ecc.) che consentono non solo di separare le principali classi di lipoproteine, ma anche le loro subfrazioni. L'isolamento, tra le varie classi di lipoproteine, di subfrazioni diverse per origine, caratteristiche chimico-fisiche e destino metabolico, è fondamentale per ottenere informazioni dettagliate sul metabolismo lipoproteico in fase postprandiale.

Il dosaggio quantitativo dell'apoB-48 e apoB-100, l'una di origine intestinale, l'altra di origine epatica, ossia delle specifiche proteine strutturali rispettivamente di chilomicroni e delle VLDL, è l'unico metodo che consente di differenziare le particelle postprandiali esogene, di origine intestinale, da quelle endogene, di origine epatica. Infatti, contrariamente alle altre apolipoproteine, l'apoB-48, come l'apoB-100, non viene scambiata con nessun'altra lipoproteina durante i processi di catabolismo e, quindi, essa è un ottimo marker delle lipoproteine postprandiali di origine intestinale.

Le tecniche di dosaggio utilizzate sono, essenzialmente, di due tipi: immunologiche ed elettroforetiche. Le tecniche immunologiche sono molto sensibili e specifiche (125).

Le tecniche elettroforetiche permettono, invece, di dosare quantitativamente le due isoforme dell'apoB, separandole in base al loro peso molecolare, ossia in base alla loro dimensione

<i>METODO</i>	<i>VANTAGGI</i>	<i>SVANTAGGI</i>
Dosaggi dei trigliceridi plasmatici	Molto semplice	Non distingue lipoproteine esogene ed endogene
Separazione di frazioni e subfrazioni di lipoproteine ricche in trigliceridi mediante ultracentrifugazione e dosaggio di apo B-48 ed apo B-100 con metodi elettroforetici (SDS-PAGE)	Separa lipoproteine esogene ed endogene. Stima il numero di particelle	Costoso, dispendioso in termini di tempo e di risorse umane
Marcatura delle lipoproteine esogene con retinil palmitato (HPLC)	Distingue chiaramente le lipoproteine esogene, almeno nella fase postprandiale precoce. Abbastanza semplice	Non distingue i chilomicroni dai remnants. Mancanza di informazioni sulle lipoproteine endogene. Possibile scambio del tracciante con le lipoproteine endogene nella fase postprandiale tardiva. Nessuna informazione sul numero delle particelle.
Isolamento di “remnants like particles” con metodi immunologici	Distingue particelle esogene ed endogene	Complesso (doppio anticorpo di elevata specificità). Stima il numero delle particelle.
Isotopi stabili (D_3 -e ^{13}C leucina)	Permette la marcatura sia dei lipidi che delle proteine	Complessità di modelli multi compartimentali. Potenzialmente utile ma al momento non esplorata nella fase postprandiale.
Risonanza magnetica nucleare con spettrometria di massa	Relativamente semplice. Distingue un ampio spettro di particelle lipoproteiche	Potenzialmente utile ma al momento non esplorata nella fase postprandiale. Apparecchiatura costosa.

(apoB-48: PM 237 kDalton; apoB-100: PM 500 kDalton) (126).

Le fasi principali del metodo per la determinazione della LPP prevedono, dopo somministrazione di un pasto test e di prelievi di sangue eseguiti a tempi determinati, la separazione, dal plasma isolato da tali prelievi, di frazioni e subfrazioni delle lipoproteine

ricche in trigliceridi mediante la tecnica dell'ultracentrifugazione preparativa in gradiente di densità discontinuo (127,128). Su tali particelle si effettua:

- dosaggio del colesterolo e dei trigliceridi
- delipidizzazione e denaturazione per l'estrazione dei costituenti proteici che caratterizzano le lipoproteine di origine intestinale e quelle di origine epatica
- dosaggi immunoenzimatici per la determinazione di Apo-B48 e ApoB-100.

Attualmente, per lo studio della lipemia alimentare sono utilizzati pasti molto diversi tra loro e ciò rende difficile il confronto tra i risultati di diversi studi e rende impossibile stabilire dei criteri di normalità della risposta lipemica (129). Per una auspicabile standardizzazione del pasto bisogna considerare diverse variabili fra cui principalmente il tipo di nutrienti da includere nel pasto (grassi/carboidrati), la composizione chimica dei grassi (saturi, monoinsaturi, polinsaturi), il contenuto calorico del pasto e il momento della sua assunzione, oltre alle variabili ambientali che sono in grado di influenzare la lipemia postprandiale, quali il fumo, l'esercizio fisico e l'assunzione di alcool (128).

Un elemento chiave è l'inclusione o meno di nutrienti diversi dai lipidi. Sono stati utilizzati, infatti, pasti composti solamente da grassi o contenenti una proporzione variabile di carboidrati, spaziando da un carico di panna a un pasto misto liquido o, più aderente alla vita reale, solido. Naturalmente un pasto costituito per il 100% da grassi, utilizzando per esempio la panna come unico componente, ha il vantaggio di essere di semplice realizzazione e più riproducibile e confrontabile in situazioni e aree geografiche diverse rispetto a un pasto misto. D'altro canto esso è troppo lontano dall'alimentazione abituale in quanto un pasto "normale" completamente privo di carboidrati è di difficile realizzazione.

Riguardo all'entità del pasto bisogna tenere conto che questa dovrebbe essere tale da stimolare il metabolismo senza compromettere l'assorbimento e i tempi di svuotamento gastrico e, in ogni caso, la palatabilità. Il quantitativo ottimale di grassi in un pasto dovrebbe essere compreso tra i 50 e gli 80 g (130,131). Condizione necessaria all'esecuzione del pasto è che questo avvenga a digiuno in quanto i livelli plasmatici di trigliceridi prima di un carico di grassi sono un elemento predittivo della risposta lipemica postprandiale (132). E' inoltre opportuno evitare l'assunzione di alcol il giorno prima del test così come l'esecuzione di attività fisica strenua in quanto essa è in grado di modificare la capacità di rimozione dei (65) trigliceridi circolanti (133). Nelle donne, poi, bisogna considerare l'eventuale assunzione di contraccettivi a base di estrogeni in quanto questi ultimi sembrano influenzare il metabolismo dei remnants dei chilomicroni (134).

Di seguito illustriamo i metodi da noi utilizzati per la caratterizzazione e quantificazione delle

lipoproteine plasmatiche e delle loro subfrazioni.

1.1 Separazione delle lipoproteine

I campioni di sangue sono stati posti a 4°C prima, durante e dopo la centrifugazione. Per minimizzare la degradazione proteolitica dell'apo B, per ogni ml di plasma sono stati aggiunti fenilmetilsulfonilfluoruro 10 mM (1µl/ml) e aprotinina alla concentrazione di 1400 µg/L (2µl/ml).

Le varie frazioni lipoproteiche sono state separate mediante la tecnica di ultracentrifugazione preparativa. Negli studi in cui è stata effettuata la separazione delle frazioni lipoproteiche (studi 2 e 4) è stata effettuata l'ultracentrifugazione in gradiente di densità discontinuo secondo Redgrave e Carlson (135), Karpe e Hamsten (1). Il metodo si basa su di un gradiente di densità a quattro livelli, costituito da plasma portato a densità di 1.10 g/ml per l'aggiunta (136) di NaBr solido (0.1268 g/ml) e da tre differenti soluzioni di NaBr di densità decrescente (1.065, 1.020, 1.006 g/ml rispettivamente).

La centrifugazione è stata effettuata in un rotore SW 40 Ti, utilizzando una ultracentrifuga Beckman Optima L-90K. In breve, con 3 corse consecutive a +15°C ed a 40000 rpm sono stati separati i chilomicroni (unità di flottazione Svedberg (Sf) > 400), le VLDL grandi (Sf 60 – 400) e le VLDL piccole (Sf 20 – 60) e ciascuna frazione recuperata dal gradiente. Da tutto ciò che rimaneva sono state isolate le HDL mediante il metodo di precipitazione. In tutte le subfrazioni lipoproteiche sono state determinate le concentrazioni di colesterolo e di trigliceridi.

Nello studio 3 le lipoproteine plasmatiche sono state separate mediante ultracentrifugazione preparativa sequenziale

3.2 Apo B-48 e Apo B-100.

Le concentrazioni di apo B-100 sono state quantizzate nei chilomicroni, nelle IDL e nelle VLDL più grandi e nelle VLDL più piccole mediante metodo immunoturbidimetrico automatizzato su strumento Cobas-Mira Autoanalyzer (ABX Diagnostics, Montpellier, France).

Le concentrazioni di Apo B48 sono state quantizzate nel plasma e nelle frazioni lipoproteiche (chilomicroni, nelle IDL e nelle VLDL più grandi e nelle VLDL più piccole) mediante metodo immunoenzimatico.

2. Determinazione del contenuto epatico di grasso

L' "American Association for the Study of Liver Diseases" (AASLD) stabilisce come limite per la diagnosi di NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) un accumulo di grasso a livello del fegato compreso tra il 5 e il 10 % del peso corporeo (139). Sulla base di questa definizione fare diagnosi di NAFLD corrisponde a determinare la percentuale di epatociti infarciti di grasso osservati in un campione di tessuto epatico ottenuto mediante biopsia analizzato con microscopia ottica.

Poiché la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare, che è considerato il metodo non invasivo più accurato per la determinazione del grasso epatico, è utilizzato più frequentemente, la percentuale di grasso epatico, oltre la quale si fa diagnosi di steatosi epatica è del 5.56 % (cioè 55.6 mg di trigliceridi per grammo di parenchima epatico). Tale valore corrisponde al 95° percentile della distribuzione di grasso epatico in una popolazione di 354 soggetti sani senza o con minimo consumo di alcol (140).

La spettroscopia di risonanza magnetica è una tecnica spettroscopica basata sulle proprietà elettromagnetiche dei nuclei di alcuni atomi. Questa tecnica consente di quantizzare precisamente il grasso epatico.

Negli studi descritti di seguito la spettroscopia di Risonanza Magnetica (^1H -MRS) è stata effettuata mediante uno scanner per Risonanza Magnetica da 1.5 T (Intera; Philips Medical Systems,

Best, The Netherlands) equipaggiato per le acquisizioni di spettroscopia protonica.

Per posizionare il voxel di acquisizione spettroscopica sono state determinate delle sezioni sagittali, coronali ed assiali dell'intero parenchima epatico. Un singolo voxel di 8 cc ($2 \times 2 \times 2$ cm) è quindi stato posizionato all'interno del lobo destro evitando le principali strutture vascolari ed il tessuto adiposo sottocutaneo e i dotti biliari. Lo spettro protonico è stato acquisito utilizzando la bobina corpo dopo aver determinato lo spessore del volume di interesse utilizzando una sequenza PRESS con i seguenti parametri: TR = 3000 ms, TE = 40 ms, 1024 punti entro un'ampiezza di spettro di 1000 KHz, 16 acquisizioni.

Il segnale di intensità del picco dell'acqua a 4.8 ppm (Sw) e quello dei gruppi metilenici- che rappresenta il contenuto intracellulare di trigliceridi nel fegato a 1.4 ppm (Sf) sono stati calcolati come integrali dei due picchi (AMARES MRUI, <http://www.mrui.uab.es/mrui/>) (Figura 10).

Il segnale di decadimento è stato corretto per i differenti decadimenti T2 dell'acqua e del grasso utilizzando la media dei tempi di rilassamento T2 di 50 e 60 ms per l'acqua ed il

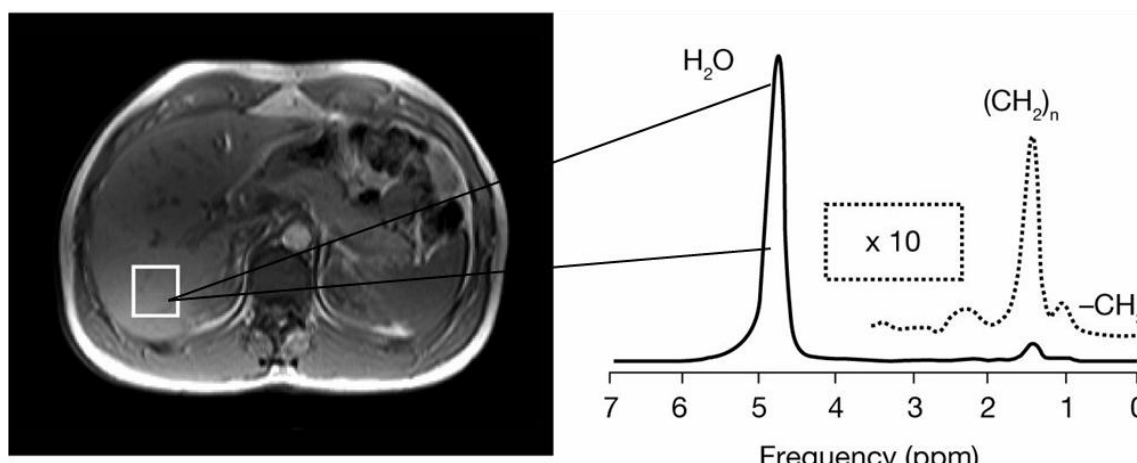


Figura 10. Determinazione del contenuto epatico di grasso mediante spettroscopia di risonanza magnetica

grasso, rispettivamente. La percentuale di grasso epatico è stata calcolata utilizzando la formula: $100 \cdot \text{Sf tata calcol.}$ Questi valori rappresentano la quantità relativa di acqua e grasso nel volume di interesse. Per convertire questi valori in concentrazioni assolute espresse come percentuale di grasso sono state applicate le equazioni validate da Longo e coll. (141,142).

3.Determinazione della distribuzione addominale del grasso mediante Risonanza Magnetica Nucleare (RMN)

Il grasso viscerale e sottocutaneo è stato determinato mediante una serie di immagini assiali T1- pesate acquisite mediante tecniche di Risonanza Magnetica lungo una regione che si estendeva per 8 cm al di sopra e al di sotto del 4° spazio interlombare utilizzando una sequenza Gradient-Echo (16 sezioni, spessore della sezione 10 mm, TR/TE = 130 ms/4*6 ms, Flip-angle 80°, in apnea).

Il volume di grasso addominale viscerale e sottocutaneo è stato misurato utilizzando un programma per analisi delle immagini interno sviluppato utilizzando Interactive Data Language (IDL, Research, Inc., Boulder, CO, USA). Il programma calcola un istogramma di intensità in pixel dell'immagini originali, e l'intensità corrispondente al nadir tra i picchi di massa magra e grassa è utilizzata



Figura 11.Determinazione della distribuzione del grasso addominale mediante risonanza magnetica nucleare; GS Grasso Sottocutaneo; GV Grasso viscerale

come soglia per definire i pixel di tessuto adiposo (cioè i pixel al di sopra del valore soglia) (143).

Successivamente, il grasso sottocutaneo è stato calcolato come la somma dei voxel di tessuto adiposo che cadevano entro la regione sottocutanea, selezionata nell'immagine originale utilizzando la procedura semi-automatizzata applicata ad un software commerciale di photo-editing (Photoshop; Adobe, Mountain View, CA, USA), mentre i restanti voxel sono stati assegnati al grasso intra-addominale (Figura 11).

3.2.d Altre determinazioni.

LIPIDI. Le concentrazioni di colesterolo e trigliceridi sono state misurate mediante metodi enzimatici colorimetrici (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) su un autoanalizzatore Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, France). Le concentrazioni plasmatiche di acidi grassi liberi sono state determinate mediante metodi enzimatici colorimetrici (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). I livelli plasmatici di insulina sono stati misurati con kits ELISA (Technogenetics, Milan, Italy).

ANTROPOMETRIA. Il peso corporeo, l'altezza e la circonferenza vita sono state misurate secondo procedure standardizzate.

CLAMP EUGLICEMICO IPERINSULINEMICO. Insulina umana è stata somministrata endovena ad una velocità costante di 1.5 mU/kg di peso corporeo/min per 2 ore. La glicemia è stata mantenuta costante intorno a 90 mg/dl modificando la velocità di infusione di glucosio sulla base delle misurazioni della glicemia su un analizzatore Accucheck (Roche, Svizzera). Come misura della sensibilità insulinica sono stati calcolati la velocità di infusione di glucosio durante gli ultimi 30 minuti del clamp (valore M) e il rapporto M/I (il valore di M è stato diviso per la concentrazione plasmatica di insulina corrispondente)(144).

STUDI

Studio 1 .Grasso epatico ed obesità: ruolo del diabete mellito tipo 2 e della distribuzione del tessuto adiposo.

(Pubblicato su European Journal of Clinical Investigation, 2011; pubblicazione in estenso n°1 in appendice)

Numerose evidenze dimostrano che il diabete tipo 2 svolge un ruolo indipendente nel determinismo della dislipidemia postprandiale (145). A questo proposito, in un nostro studio precedente (146) abbiamo studiato due gruppi di pazienti obesi con e senza diabete e un gruppo di controllo di soggetti sani per differenziare il ruolo del DM2, dell'obesità e dell'insulino-resistenza nel determinismo delle alterazioni della lipemia postprandiale. In questo studio, i soggetti con obesità e diabete (OD) ed i soggetti con obesità e senza diabete (OND) erano normolipidemici a digiuno ed erano comparabili sia per grado di adiposità (indice di massa corporea, circonferenza vita, massa grassa) che per insulino-sensibilità misurata mediante clamp iperinsulinemico euglicemico. I risultati di questo studio hanno mostrato che i soggetti OD ed OND presentavano, rispetto ai controlli, un aumento delle concentrazioni postprandiali dei lipidi delle VLDL, e che i pazienti OD presentavano un incremento significativo anche rispetto ai soggetti OND delle concentrazioni postprandiali dei lipidi dei chilomicroni. Ciò suggeriva che il diabete mellito tipo 2, in questi gruppi di pazienti normolipidemici a digiuno e in buon controllo metabolico, svolgesse un ruolo indipendente dall'obesità e dall'insulino-resistenza nel determinismo di specifiche alterazioni della lipemia postprandiale.

Pertanto, al fine di identificare meglio le caratteristiche che si associassero indipendentemente al diabete e che potessero essere in relazione con le alterazioni della lipemia postprandiale precedentemente osservate, in questi gruppi di pazienti, abbiamo studiato anche la distribuzione del tessuto adiposo addominale ed il contenuto epatico di grasso.

La steatosi epatica si associa ad insulino-resistenza periferica ed epatica e a condizioni ad essa correlate quali l'obesità e in particolare l'obesità viscerale (147). Questa stretta relazione suggerisce che il contenuto epatico di grasso sia aumentato anche in pazienti con DM2 che molto frequentemente presentano sia insulino-resistenza che obesità. Tuttavia, le evidenze scientifiche disponibili non sono in grado di definire il ruolo specifico del diabete,

indipendentemente da obesità, distribuzione del grasso addominale ed insulino-resistenza, nell'associazione con la steatosi epatica. Infatti, gli unici due studi precedenti che hanno valutato questo aspetto hanno dei limiti metodologici (metodo utilizzato per la quantizzazione del grasso epatico (33), tipo di soggetti (34) studiati) che non consentono di risolvere tale problematica.

Dati recenti mostrano anche che persone con diabete mellito tipo 2 hanno una minore quantità di grasso sottocutaneo rispetto a soggetti non diabetici (18). Ciò suggerisce che la distribuzione del grasso addominale può svolgere un ruolo nella relazione tra diabete e grasso epatico.

Obiettivo

Valutare la relazione tra diabete mellito tipo 2 e contenuto epatico di grasso, indipendentemente da obesità ed insulino-resistenza sistemica. A questo scopo abbiamo misurato il contenuto epatico di grasso mediante spettroscopia di risonanza magnetica (^1H RMN) e l'insulino-sensibilità mediante clamp euglicemico iperinsulinemico in due gruppi assolutamente comparabili di pazienti obesi con e senza diabete e in un gruppo di soggetti magri di controllo. Abbiamo inoltre determinato la distribuzione del grasso addominale mediante Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) per studiare la sua relazione con l'accumulo di grasso epatico.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio: 13 uomini obesi con diabete mellito tipo 2 in controllo glicemico ottimale (HbA1c : $6.8 \pm 0.8\%$, $M \pm \text{SD}$ con dieta ($n=8$) o con dieta+metformina ($n=5$), 10 uomini obesi senza diabete e 10 soggetti sani. Le caratteristiche principali dei soggetti sono mostrate nella tabella 1. I soggetti obesi con e senza diabete avevano un indice di massa corporea compreso tra 30 e 40 kg/m^2 ed avevano normali livelli a digiuno di lipidi plasmatici (trigliceridi $<150 \text{ mg/dl}$ e colesterolo inferiore a 210 mg/dL), in assenza di terapia ipolipidemizzante. I partecipanti allo studio non presentavano storia o sintomi di altre malattie a parte il diabete, non erano vegetariani o impegnati in attività fisica intensa.

Disegno dello studio

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a: prelievo di sangue venoso a digiuno, determinazione delle misure antropometriche mediante metodologie standardizzate, valutazione del contenuto epatico di grasso mediante ^1H -SRM, determinazione del grasso viscerale e sottocutaneo mediante RMN, determinazione della sensibilità insulinica sistemica mediante clamp euglicemico iperinsulinemico.

Analisi statistica

Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante il test ANOVA (ANalysis Of VAriance) ed il test post hoc tra i gruppi (LSD). Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo trasformazione logaritmica o con test non parametrici. Una $p < 0.05$ è stata considerata statisticamente significativa. L'analisi statistica è stata eseguita in accordo a metodi standard usando il software SPSS (SPSS/PC, SPSS, Inc., Chicago, IL).

Risultati

I partecipanti DO e NDO erano paragonabili per indice di massa corporea e circonferenza vita (Tabella 1). Come dimostrato dal basso valore di rapporto M/I durante il clamp di insulina essi presentavano una riduzione simile della sensibilità all'insulina rispetto ai controlli.

Di conseguenza, anche a digiuno avevano livelli di insulina significativamente più alti rispetto ai controlli (Tabella 1).

Le concentrazioni plasmatiche di ALT erano significativamente più alte in DO rispetto ai soggetti di controllo ($P = 0.04$), mentre la differenza con i soggetti NDO non era significativa ($P = 0.53$) (Tabella 1). Tutti i partecipanti avevano concentrazioni plasmatiche di trigliceridi e colesterolo a digiuno entro i livelli desiderabili (Tabella 1).

TABELLA 1. Caratteristiche principali dei partecipanti allo studio

	Diabetici Obesi	Obesi	Controllo
Maschi (n)	13	10	9
Età (anni)	53±9	47±9	40±2
IMC (kg/m²)	33.2±2.3	34.2±2.5	23.8±1.2
Circonferenza vita (cm)	109±7	111±7	84±5
Colesterolo plasmatico	177±32	189±39	156±28
Trigliceridi plasmatici	117±98	98±20	83±37
HDL-Colesterolo	41±8	39±8	43±7
AST	26±13	27±11	21±7
ALT	37±26	32±9	20±5
Glucosio Plasmatico	131±22	87±13	79±15
Insulina plasmatica	14.9±5.0	15.3±7.3	6.9±4.0
M/I (mg/kg/min/mU/L)	2.1±0.2	1.9±0.8	6.5±2.9

AST, aspartato transaminasi; ALT alanina transaminasi; i dati sono espressi come media±DS; *

$P < 0.05$ vs. controlli ** $P < 0.001$ vs. controlli; § $p < 0.05$ vs. obesi.

Contenuto di grasso del fegato. Il contenuto epatico di grasso, misurato con $^1\text{H-SRM}$, è risultato significativamente maggiore nei soggetti DO ($11.9 \pm 7.0\%$) che nei soggetti NDO ($5.2 \pm 2.8\%$, $P < 0.05$) o nei controlli (1.6 ± 1.0 , $P < 0.001$) (Fig. 1).

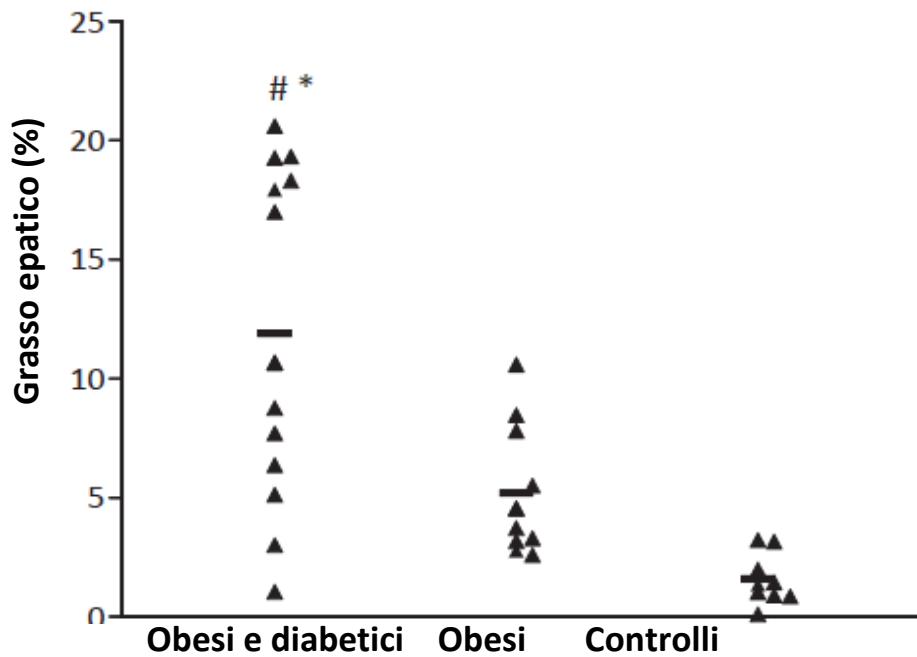


Figura 1 Contenuto epatico di grasso nei pazienti obesi e diabetici, nei pazienti obesi non diabetici e nei controlli

Distribuzione del grasso addominale. Come previsto, il grasso addominale totale era significativamente più alto nei soggetti obesi senza diabete ($8.041 \pm 1.933 \text{ cm}^3$) rispetto ai controlli ($3457 \pm 729 \text{ cm}^3$, $P < 0.0001$). Tuttavia, anche se il tessuto adiposo viscerale era solo leggermente più abbondante nei pazienti DO che in quelli NDO (3184 ± 843 vs 2844 ± 1378 , $p = 0.438$), il tessuto adiposo sottocutaneo (4029 ± 1362 vs 5198 ± 1398 , $p < 0.05$) e il rapporto tessuto sottocutaneo/viscerale (1.30 ± 0.39 vs 2.11 ± 0.96 , $P < 0.05$) erano significativamente più bassi nei DO rispetto ai soggetti NDO (Figura 2).

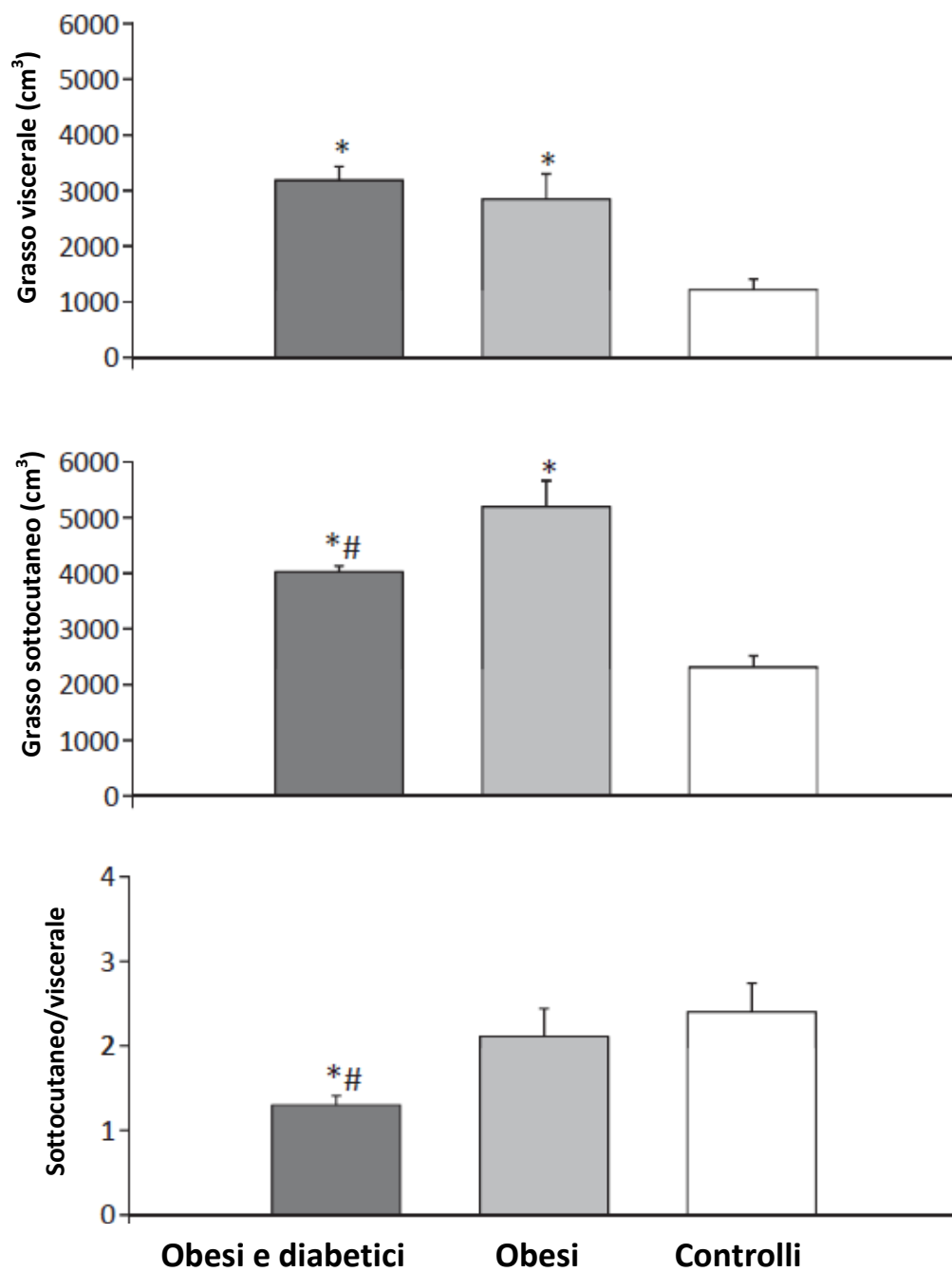


Figura 2. Grasso addominale viscerale, sottocutaneo e rapporto sottocutaneo/viscerale nei pazienti obesi e diabetici, obesi, e nei soggetti di controllo. * $P < 0.01$ vs. controlli; # $p < 0.05$ vs. obesi

Discussione

In questo studio, i pazienti diabetici obesi avevano un contenuto epatico di grasso significativamente maggiore sia rispetto ai controlli magri che agli individui ugualmente obesi ma non diabetici. Poiché i soggetti obesi con e senza diabete erano tutti uomini con normali livelli di trigliceridi a digiuno, con gradi di adiposità e insulino-sensibilità sistemica strettamente comparabili, i nostri risultati sono i primi a dimostrare, senza alcuna correzione per fattori confondenti, che i pazienti obesi con diabete di tipo 2 hanno un maggiore accumulo di grasso nel fegato, anche in assenza di altre anomalie metaboliche importanti. Diversi meccanismi possono spiegare l'aumento del grasso epatico osservato nei partecipanti con diabete di tipo 2 del nostro studio. Poiché il diabete era associato ad accumulo di grasso epatico indipendentemente dall'insulino-resistenza sistemica e dall'obesità, dovrebbero essere considerati altri fattori specificamente connessi con il diabete.

L'iperglicemia è ovviamente il più specifico di questi fattori. Tuttavia, ad oggi non esistono dati nell'uomo riguardanti gli effetti dell'iperglicemia di per sé sull'accumulo di grasso epatico.

D'altra parte studi in persone magre, obese, diabetiche magre o obese, con steatosi epatica non alcolica, dimostrano concordemente che l'accumulo di grasso a livello epatico correla con l'insulino-resistenza epatica (147-149). Ciò suggerisce che i nostri pazienti obesi diabetici potrebbero avere una maggiore insulino-resistenza epatica rispetto ai soggetti obesi non diabetici e quindi che l'iperglicemia sarebbe la causa e non la conseguenza dell'accumulo di grasso a livello epatico.

Un altro aspetto specifico del diabete è la disfunzione beta cellulare. Studi che hanno valutato la relazione tra steatosi epatica e secrezione insulinica non hanno dimostrato relazioni tra quantitativo epatico di grasso e funzione beta cellulare in persone con DM2 e intolleranza ai carboidrati (150). Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che l'accumulo di grasso a livello del pancreas determina disfunzione beta cellulare in pazienti diabetici e non (151).

Un altro risultato rilevante di questo studio è che i soggetti diabetici obesi presentavano rispetto agli obesi non diabetici un minor quantitativo di grasso addominale sottocutaneo.

Questo risultato è in linea con quanto osservato in uno studio condotto su di un gran numero di pazienti che ha dimostrato che i pazienti con diabete rispetto a quelli sovrappeso non diabetici presentavano un quantitativo minore di grasso sottocutaneo corporeo (18).

I nostri risultati dimostrano, quindi, che il diabete di tipo 2 è associato ad un aumentato accumulo di grasso nel fegato, indipendentemente da obesità e insulino-resistenza sistemica. Il maggiore contenuto di grasso del fegato è probabilmente l'espressione di una alterazione più generalizzata della distribuzione del grasso, che potrebbe portare allo sviluppo di diabete perché coinvolge siti chiave del metabolismo del glucosio, come il muscolo, il fegato e le cellule beta

Studio 2. Effetti di una dieta ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico sulle alterazioni lipidiche postprandiali del diabete tipo 2.

(Pubblicato su Diabetes Care, 2009; Pubblicazione in estenso n° 2 in appendice)

I due approcci nutrizionali attualmente consigliati per il trattamento del diabete tipo 2 consistono o in una dieta ricca in carboidrati (CHO) e fibre o in una dieta povera in CHO e ricca in grassi monoinsaturi.

Dalle evidenze attualmente disponibili si deduce che una dieta ad alto contenuto in CHO, rispetto ad una dieta ricca in grassi monoinsaturi, è meno efficace sul profilo lipidico a digiuno in quanto determina un aumento dei trigliceridi plasmatici (152). Tuttavia, questi effetti negativi possono essere evitati se si scelgono alimenti ricchi in CHO, ma con basso indice glicemico e/o ricchi in fibre. Esistono, invece, pochi dati in letteratura sugli effetti di queste diete sulle alterazioni lipidiche e lipoproteiche in fase postprandiale in pazienti con diabete mellito tipo 2.

Obiettivo

Confrontare l'effetto di una dieta ricca in CHO, fibre e a basso indice glicemico (in seguito indicata come Mediterranea), con una dieta relativamente povera in CHO e ricca in acidi grassi monoinsaturi sulla lipemia postprandiale in pazienti diabetici tipo 2.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio 18 pazienti con diabete mellito tipo 2, in buon compenso glicemico ($HbA1c: 6.9 \pm 0.7\%$) con sola dieta ($n=13$) o dieta + metformina ($n=5$) e con normali livelli di lipidi a digiuno (colesterolo: 159 ± 30 mg/dl, trigliceridi: 103 ± 35 mg/dl). I pazienti erano in lieve sovrappeso ($IMC: 27 \pm 3$ kg/m²). Nessun paziente assumeva farmaci ipolipidemizzanti. I soggetti non avevano storia o sintomi associati ad altre malattie, eccetto il diabete. Nessuno era vegetariano e/o impegnato in attività fisica intensa.

Disegno sperimentale

Lo studio è stato eseguito secondo un disegno sperimentale randomizzato di tipo cross-over con somministrazione di due diete isoenergetiche a diverso contenuto in grassi (MUFA), carboidrati (CHO) e fibre. Dopo un periodo di osservazione (run-in) di circa 4 settimane, durante il quale tutti i pazienti hanno seguito la loro dieta abituale, ciascun paziente ha seguito una delle due diete per quattro settimane. Successivamente, ogni paziente ha seguito, ancora per quattro settimane, l'altro regime dietetico. Tutti i pazienti hanno

incontrato settimanalmente una dietista e compilato un diario alimentare di tre giorni per valutare la loro adesione al trattamento dietetico. Le caratteristiche delle due diete isoenergetiche sono riportate in tabella 1. La dieta Mediterranea era composta da CHO per il 52% dell'energia totale, conteneva 28 g di fibre /1000 kcal, ed era a basso indice glicemico (58%); la dieta povera in CHO, ricca in MUFA era composta da CHO per il 45% dell'energia totale, conteneva 8 g di fibre /1000 kcal, ed era ad alto indice glicemico (88%). Le due diete non differivano rispetto agli altri componenti (proteine, grassi saturi).

La diversa composizione di nutrienti delle due diete è stata ottenuta grazie ad un'appropriata scelta degli alimenti e del condimento. Per la dieta Mediterranea gli alimenti predominanti erano i legumi (fagioli, ceci, lenticchie etc.), i vegetali (bieta, carciofi, finocchi, spinaci etc.), la frutta (pere, mele, arance etc.) e i cereali ricchi in fibre (bastoncini di crusca di frumento, pane di tipo integrale), mentre per la dieta povera in CHO, ricca in MUFA, l'olio extra vergine di oliva rappresentava il condimento caratterizzante (circa 60-80g al giorno).

Procedure sperimentali

Al termine di ciascun periodo di trattamento dietetico i pazienti hanno effettuato: 1) prelievi di sangue venoso per la determinazione a digiuno (12 h) di colesterolo e trigliceridi totali, delle HDL e delle LDL 2) un pasto test di composizione simile al trattamento dietetico seguito e prelievi prima e dopo 2, 4 e 6 ore dal pasto standard per la determinazione di glucosio, insulina, colesterolo e trigliceridi nel plasma e nelle subfrazioni lipoproteiche (chilomicroni, VLDL grandi e piccole, IDL, LDL, HDL); alla fine del periodo di trattamento con la dieta Mediterranea il pasto era consistito in pasta e fagioli e 150 g di mele, con un contenuto calorico pari a 948 kcal. Esso era composto per il 30% da grassi, di cui il 7% da grassi saturi, per il 52% da carboidrati, per il 18% da proteine ed aveva un indice glicemico pari al 52%). Invece, alla fine del periodo con la dieta povera in CHO e ricca in MUFA il pasto test era consistito in un gateau di patate e 250 g di succo d'arancia, con un contenuto calorico uguale a quello del precedente pasto ma con una percentuale di nutrienti differente: 37% di grassi, di cui il 7% di saturi, il 45% di carboidrati, il 18% di proteine e un indice glicemico pari al 96% (4).

Analisi statistica

I dati sono espressi come Media \pm ES. La risposta postprandiale è stata valutata come area incrementale sotto la curva (Incremental Area Under Curve, IAUC) calcolata con il metodo trapezoidale. Le differenze tra le due diete sono state valutate mediante t-test per dati appaiati. Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo trasformazione logaritmica o tramite test non parametrici. Una $p < 0.05$ è stata considerata statisticamente

significativa. L'analisi statistica è stata eseguita in accordo ai metodi standard usando il software SPSS (SPSS/PC, SPSS, Inc., Chicago, IL).

Risultati

Adesione al trattamento. Non ci sono state differenze del peso corporeo alla fine dei due differenti approcci dietetici.

L'adesione ad entrambe le diete è stata ottima (tabella 1). Come atteso, le diete seguite dai pazienti differivano significativamente solo per il contenuto in grassi totali, MUFA, CHO, fibre, indice glicemico e carico glicemico (tabella 1).

Tabella.1
Composizione delle due diete

	Dieta Mediterranea		Dieta povera in CHO	
	Raccomandata	Seguita (M±DS)	Raccomandata	Seguita (M±DS)
Energia totale (kcal/die)	1918	1874±315	1939	1862±348
Proteine (%)	18	18±1	18	18±1
Grassi totali (%)	30	30±1*	37	37±1
Saturi(%)	3	7±1	7	7±1
Monoinsaturi (%)	17	17±1*	23	23±1
Polinsaturi n-6 fat (%)	3.9	4.2±0.3	4.2	4.3±0.3
Colesterolo (g/die)	143	133±43	158	160 ±32
Carboidrati (%)	52	51±1*	45	44±1
Fibre (g/1000 Kcal)	28	27±2*	8	8±1
Indice glicemico (%)	58	60±4*	88	87±2
Carico glicemico (%)	155	154±24*	205	207±37

* p<0.05 vs. dieta povera in CHO

Lipidi a digiuno. Gli effetti delle due diete sui lipidi plasmatici sono mostrati nella tabella 2: alla fine della dieta Mediterranea si è verificata una riduzione significativa del colesterolo totale, del colesterolo LDL e del colesterolo HDL ($p<0.05$) e un incremento dei trigliceridi delle HDL rispetto alla dieta povera in CHO e ricca in MUFA

Tabella 2

**Colesterolo e trigliceridi totali, delle LDL e delle HDL a digiuno alla fine dei due pe
di dieta**

	Dieta Mediterranea	Dieta povera in CHO
Colesterolo totale (mg/dl)	162±27 *	170±30
Trigliceridi totali (mg/dl)	96±29	89±31
LDL Colesterolo (mg/dl)	101±23 *	109±24
LDL Trigliceridi (mg/dl)	15±4.0	16±4.7
HDL Colesterolo (mg/dl)	38±9.6 *	41±10
HDL Trigliceridi (mg/dl)	18±4.8 *	16±4.1
M± DS, * $p<0.05$		

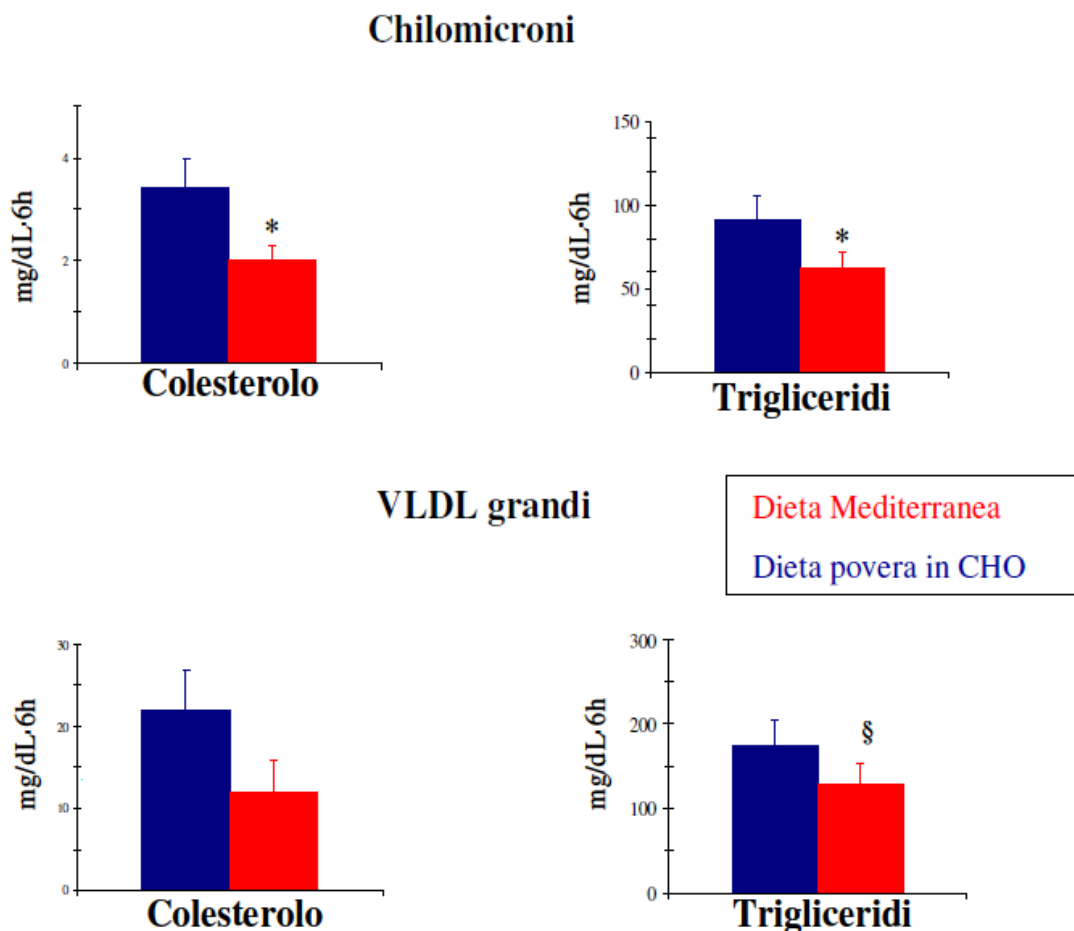
Lipemia postprandiale: lipidi del plasma. Al termine della dieta Mediterranea l'area incrementale postprandiale dei trigliceridi era ridotta del 31% rispetto alla dieta povera in CHO ($p=0.06$) mentre non vi erano differenze significative per l'area incrementale del colesterolo.

Lipemia postprandiale: lipidi delle lipoproteine. I risultati relativi alla risposta postprandiale delle lipoproteine ricche in trigliceridi sono riportati in figura 1 come IAUC del colesterolo e dei trigliceridi dei chilomicroni e delle VLDL grandi. Sia i trigliceridi che il colesterolo dei chilomicroni erano più bassi dopo il pasto somministrato al termine della dieta Mediterranea, e l'area incrementale era significativamente più bassa ($p < 0.05$ sia per i trigliceridi che per il colesterolo; figura 1).

Lo stesso si è osservato per quanto riguarda i trigliceridi delle VLDL grandi (IAUC 129 ± 83 vs. 174 ± 108 mg/dl \times 6h, $p < 0.06$) (figura 1), delle VLDL piccole (IAUC -19 ± 21 vs. -13 ± 19 mg/dl \times 6h, $P=0.07$) e delle LDL (IAUC -4 ± 5 vs. 15 ± 4 mg/dl \times 6h, $p < 0.05$).

Figura 1

Aree incrementali postprandiali per colesterolo e trigliceridi nel plasma, nei chilomicroni e nelle VLDL grandi dopo il pasto test alla fine delle due diete



M \pm ES, * $p < 0.05$, § $=0.06$

Discussione

Questo studio mostra chiaramente, per la prima volta, che una dieta moderatamente ricca in CHO, ricca in fibre e, quindi, anche con un basso indice glicemico e carico glicemico, induce una significativa riduzione delle lipoproteine ricche in trigliceridi in fase postprandiale, in particolare dei chilomicroni, in pazienti con diabete tipo 2.

Le due diete potrebbero agire mediante altri meccanismi, in particolare sull'assorbimento degli acidi grassi della dieta e del colesterolo e sulla produzione di chilomicroni e VLDL. Infatti, da una parte, la dieta povera in CHO e ricca in MUFA essendo più ricca in grassi, maggiori determinanti della risposta lipidica postprandiale, potrebbe indurre un più intenso assorbimento di acidi grassi e quindi determinare una più rivelante produzione di chilomicroni. Dall'altra parte, essendo la dieta Mediterranea allo stesso tempo ricca in CHO e fibre, potrebbe agire attraverso diversi meccanismi, per esempio ritardando lo svuotamento gastrico, riducendo l'assorbimento di glucosio, colesterolo, acidi grassi ed, infine, riducendo la produzione intestinale di chilomicroni, come è descritto in studi in vitro e in vivo (153). In questo studio non abbiamo determinato le Apo B48 e Apo B100 delle diverse lipoproteine. Per tale motivo non possiamo con precisione differenziare le lipoproteine esogene da quelle endogene ma è probabile che la dieta Mediterranea, possa determinare i suoi effetti limitando la produzione endogena di VLDL oltre che riducendo la secrezione e produzione di chilomicroni.

La rilevanza clinica dei risultati di tale studio risiede nel fatto che la lipemia postprandiale è considerata un fattore di rischio cardiovascolare indipendente. Inoltre, abbiamo detto che, i pazienti con diabete tipo 2 sono caratterizzati da frequenti e molteplici anomalie del metabolismo in fase postprandiale che, potrebbero in parte spiegare il loro elevato rischio cardiovascolare. Quindi, proprio in questi pazienti, risulta particolarmente utile un approccio nutrizionale di questo tipo capace di influenzare anche le anomalie lipidiche postprandiali in aggiunta agli altri fattori di rischio cardiovascolare.

In conclusione, questo tipo di dieta, relativamente ricca in CHO, ricca in MUFA e a basso indice glicemico, per i suoi effetti benefici sulle alterazioni lipoproteiche in fase postprandiale, potrebbe rappresentare la dieta di scelta nel trattamento dietetico del diabete tipo 2.

Studio 3. Effetti di modifiche qualitative della dieta e dell'attività fisica aerobica sulla lipemia postprandiale e sul grasso epatico.

I dati sul grasso epatico sono stati sottomessi per la pubblicazione in Diabetes Care con il titolo “An isoenergetic MUFA diet reduces liver fat in type 2 diabetes independently of aerobic training”. (Studio n°3 in appendice)

La steatosi epatica e la lipemia postprandiale sono due condizioni strettamente correlate che si associano al diabete mellito tipo 2.

E' possibile che le stesse strategie terapeutiche non farmacologiche (dieta ed attività fisica) efficaci nella terapia del diabete influenzino anche l'accumulo di grasso nel fegato e le modifiche postprandiali delle lipoproteine.

In pazienti con diabete mellito tipo 2 una dieta ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico, rispetto ad una dieta ricca in MUFA migliora la risposta lipidemica postprandiale (154). Non è noto se questi approcci nutrizionali, comunemente consigliati per la terapia del diabete, influenzino anche il contenuto epatico di grasso. Inoltre non sono mai stati valutati gli effetti di un programma di attività fisica aerobica, da solo o in associazione a questi approcci nutrizionali sulle modifiche delle lipoproteine postprandiali e sul grasso epatico.

Obiettivi

Comparare, in pazienti con diabete mellito tipo 2, gli effetti sul contenuto epatico di grasso e sulla lipemia postprandiale di un intervento di otto settimane con una dieta relativamente ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico e di una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi, (cioè i due approcci dietetici maggiormente raccomandati per la terapia del diabete). Questo studio ha anche valutato gli effetti sul contenuto epatico di grasso e sulla lipemia postprandiale dell'aggiunta a questi approcci dietetici di un programma strutturato supervisionato di attività fisica aerobica.

Soggetti: Sono stati reclutati 45 soggetti (37 uomini e 8 donne in post-menopausa) con diabete di tipo 2 presso l'ambulatorio di diabetologia del Dipartimento di Medicina Interna del Policlinico Universitario Federico II. I pazienti erano in sovrappeso o obesi, con peso corporeo stabile negli ultimi sei mesi, e con un controllo soddisfacente della glicemia con dieta o metformina + dieta. I partecipanti avevano normali livelli di lipidi plasmatici a digiuno e non assumevano farmaci ipolipemizzanti. I soggetti non avevano segni o sintomi di malattia epatica di qualsiasi natura, o di qualsiasi altra malattia, a parte il diabete. Il loro consumo di alcol era <20 g/ die. Non erano vegetariani o impegnati in attività fisica intensa. Dei 45 partecipanti arruolati, 4 (uno in ogni gruppo) si sono ritirati dallo studio prima di

effettuare le determinazioni finali o perchè si sono trasferiti in altre città o per problemi di lavoro. Inoltre, nonostante il loro precedente consenso 5 soggetti hanno rifiutato di sottoporsi all'esame H¹SRM per claustrofobia. Pertanto i dati presentati si riferiscono ai 36 partecipanti che sono stati sottoposti a misura del grasso epatico, le cui caratteristiche principali sono riportate nella tabella 1.

Tabella 1 Caratteristiche dei pazienti con diabete mellito tipo 2 partecipanti allo studio.

	CHO/fibre	MUFA	CHO/fibre+Ex	MUFA+Ex
Partecipanti (M/F)	7/2	6/2	7/3	9/0
Età (years)	58±5	57±8	63±5	57±9
IMC (kg/m ²)	30±2	28±3	31±3	30±4
HbA1c (%)	6.3±0.3	6.6±0.8	6.5±0.7	6.9±0.6
Terapia del diabete (Dieta /Metformina)	3/6	3/5	2/8	2/7

Disegno dello studio

L'intervento è stato preceduto da un periodo di run-in di 3 settimane durante il quale i partecipanti hanno seguito una dieta non molto diversa dall'abituale (CHO 48%, grassi totali 33 %, grassi saturi il 13%, proteine 18% dell'apporto energetico totale). Secondo un disegno fattoriale 2x2 randomizzato a gruppi paralleli, i partecipanti sono stati assegnati ad uno dei seguenti gruppi di intervento per un periodo di 8 settimane: a. dieta ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico (gruppo CHO /fibre), b. dieta ricca in MUFA (gruppo MUFA), c. dieta ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico più programma di attività fisica (CHO / fibra + Ex), d. dieta ricca in MUFA più programma di attività fisica (MUFA + Ex gruppo).

Le diete sperimentali erano isoenergetiche al fine di mantenere costante il peso corporeo e differivano per la composizione di macronutrienti: CHO 52 vs 40%, fibre 28 vs 10 g/1000

kcal, indice glicemico (in riferimento al pane) 60 vs 95%, grasso 30 vs 42%, acidi grassi monoinsaturi 16 vs 28%, per CHO / dieta ricca di fibre e la dieta acidi grassi monoinsaturi, rispettivamente. Gli altri componenti, compreso il contenuto di grassi saturi (7%), sono risultati simili nei due diete.

Il programma strutturato di esercizio è stato effettuato presso il Centro di Riabilitazione cardiologica del Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Cardiovascolari. I partecipanti si esercitavano su tapis roulant o cicloergometro tre volte alla settimana per 45 minuti più il riscaldamento e il raffreddamento ad un'intensità pari al 50-70% del loro VO2 max.

Procedure sperimentali: prima e dopo ciascun periodo di trattamento dietetico i pazienti hanno effettuato un pasto test con la determinazione a digiuno e dopo 2, 4 e 6 h di glucosio, insulina, colesterolo e trigliceridi nel plasma e nelle subfrazioni lipoproteiche (separate mediante ultracentrifugazione sequenziale preparativa) con densità maggiore (VLDL e chilomicroni) e inferiore (LDL e HDL) a 1.006. Il pasto test effettuato prima del periodo di intervento aveva la stessa composizione della dieta del run-in per tutti i partecipanti mentre quello effettuato alla fine dell'intervento aveva la stessa composizione della dieta seguita e quindi variava in base al gruppo di intervento.

Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm DS se non diversamente specificato. Le differenze tra i quattro gruppi al basale sono stati testati mediante ANOVA e relativa analisi post-hoc. Gli effetti dei quattro interventi sono stati valutati mediante ANOVA a due vie per misure ripetute. I cambiamenti nel contenuto di grasso del fegato sono stati valutati come variazioni percentuali $[(\text{valori finali} - \text{valori basali}) / \text{valori di base} \times 100]$ in un modello lineare generale prendendo il cambiamento di grasso nel fegato come variabile dipendente, tipo di dieta e la presenza / assenza di programma di attività fisica come fattori fissi e il valore al basale di grasso epatico come covariata. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato significativo. L'analisi statistica è stata eseguita secondo i metodi standard utilizzando il pacchetto statistico di Scienze Sociali software (SPSS / PC, SPSS, Chicago, IL).

Risultati

L'adesione alla dieta è stata ottima (Tabella 2).

Tabella 2. Composizione della dieta durante l'intervento di 8 settimane nei 4 gruppi di soggetti.

	CHO/fibre	MUFA	CHO/fibre+Ex	MUFA+Ex
Introito Calorico totale (kcal/die)	1873±407	2039±431	2037±456	2480±362*
Proteine (% ET)	19±2	18±2	18±1	18±1
Grassi (% ET)	28±1	42±1 [†]	29±1	42±2 [†]
<i>Saturi</i> (% ET)	6.0±0.8	6.7±0.5	6.2±0.8	6.7±0.5
<i>Monoinsaturi</i> (% ET)	16±1	27±1 [†]	17±1	28±1 [†]
<i>Poliinsaturi</i> (% ET)	3.8±0.5	4.6±0.5	3.7±0.2	4.5±0.6
Carboidrati (% TE)	53±2	40±1 [†]	53±1	40±1 [†]
Fibre (g/1000 kcal)	26±4	9±1 [†]	26±2	8±2 [†]
Indice glicemico (%)	60±3	94±5 [†]	59±1	92±4 [†]
Carico glicemico	15651±3712	20326±4507 [†]	16183±3457	24469±4338 [†]
Polifenoli (mg/die)	88±29	62±25 [†]	126±49	60±23 [†]
Total ORAC (mmolET/100 g)	13886±5820	9657±2670 [†]	18149±4612	9362±2622 [†]
Vitamina C (mg/die)	241±113	134±51 [†]	269±102	128±40 [†]
Vitamina E (mg/die)	16±5	22±5 [†]	17±4	27±3 [†]

CHO: carboidrati; MUFA: acidi grassi monoinsaturi; ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

* p<0.05 vs. altri gruppi; † p<0.05 vs. CHO/fibre e CHO/fibre +Ex analisi post hoc ANOVA

Grasso epatico. Il grasso epatico, misurato mediante H¹SRM, si è ridotto significativamente nel gruppo MUFA+Ex (11.6 ± 8.0 vs. $9.1 \pm 7.4\%$; $p=0.02$) e nel gruppo MUFA (7.4 ± 2.8 vs. $5.2 \pm 2.7\%$; $p=0.01$); non si è modificato significativamente nel gruppo CHO/fibre+Ex (8.8 ± 4.9 vs. $8.9 \pm 5.7\%$; $p=0.794$) e nel gruppo CHO/fibre (17.7 ± 9.7 vs. $16 \pm 6.8\%$; $p=0.295$). Al fine di correggere le differenze basali tra i gruppi nel contenuto epatico di grasso, abbiamo valutato anche le differenze tra le variazioni percentuali. L'analisi statistica mediante modello lineare generalizzato ha evidenziato che la dieta ma non l'attività fisica o l'interazione dieta x attività fisica ha influenzato il contenuto epatico di grasso. Il grasso epatico si è ridotto maggiormente con la dieta MUFA (-25% con e -29% senza esercizio) che con la dieta CHO (-6% con e -4% senza esercizio) ($p<0.05$) (Figura 1).

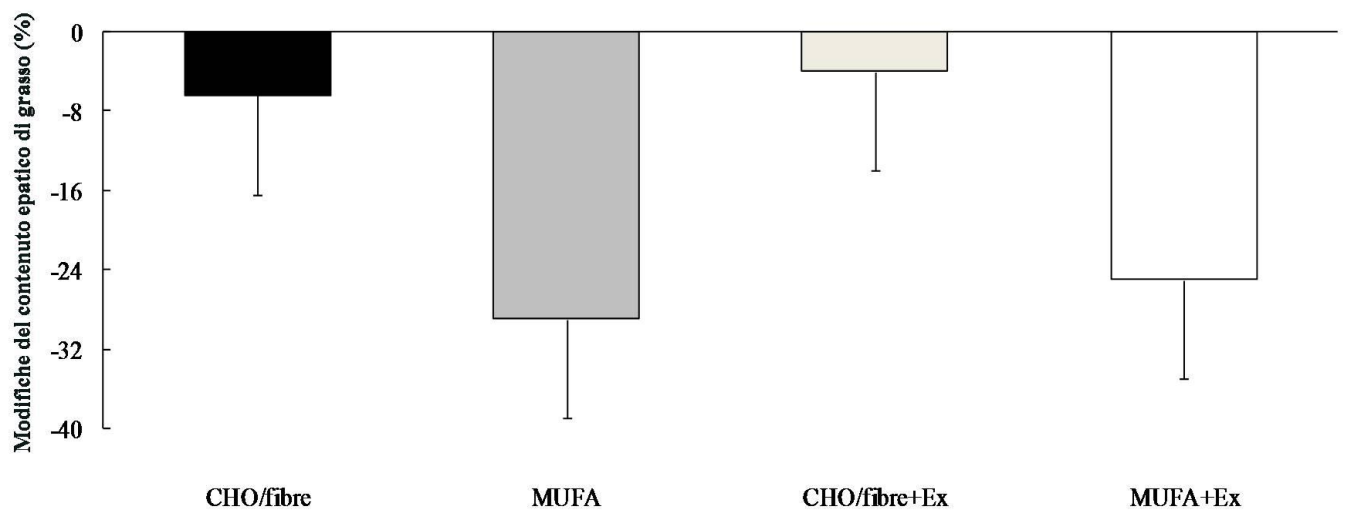


Figura 1. Modifiche percentuali del contenuto epatico di grasso dopo l'intervento nei quattro gruppi; I dati sono espressi come $M \pm ES$; $p<0.05$ per l'effetto della dieta; NS per l'effetto dell'esercizio; NS per l'effetto dell'interazione dieta x attività fisica in base modello lineare generalizzato.

Lipemia postprandiale. La lipemia postprandiale è stata valutata mediante il calcolo dell'area incrementale postprandiale dei lipidi contenuti nelle lipoproteine ricche in trigliceridi (VLDL + chilomicroni). Gli effetti dei trattamenti sono stati valutati confrontando le variazioni percentuali delle aree incrementali del pasto-test finale rispetto alle aree incrementali del pasto- test iniziale .

L'area incrementale dei trigliceridi nella frazione chilomicroni + VLDL si è ridotta nel gruppo CHO/fibre (-36%) ed è aumentata nei gruppi MUFA (29%), e MUFA+Ex (54%). Ciò determinava una differenza statisticamente significativa per l'effetto della dieta ($p = 0.005$ in base al modello lineare generalizzato), mentre né l'attività fisica da sola, né l'interazione della dieta con l'attività fisica modificavano la risposta postprandiale nei quattro gruppi (Fig. 2).

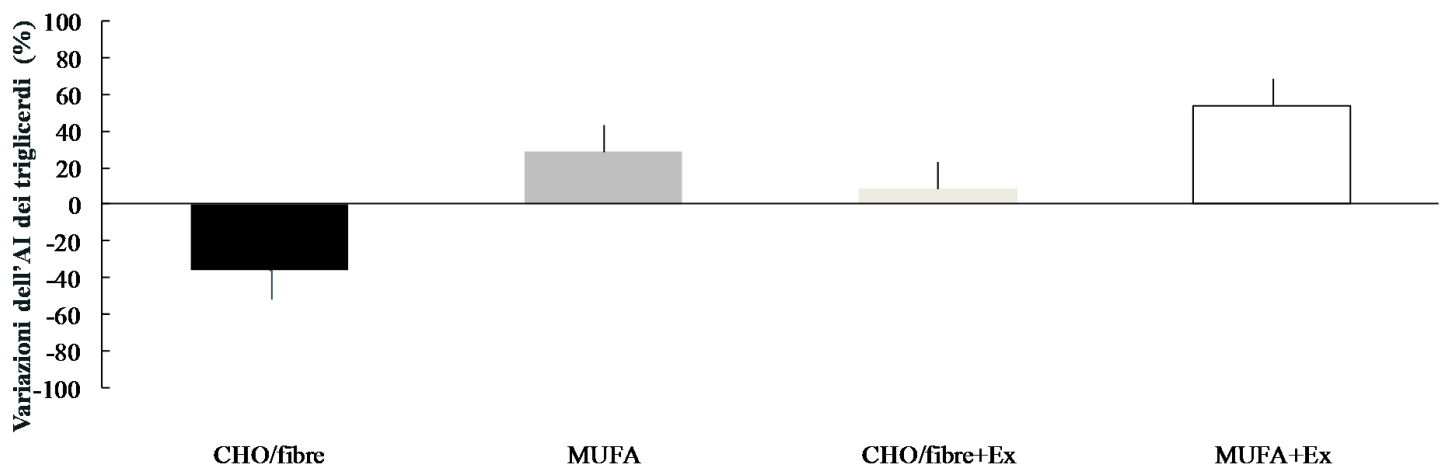


Figura 2. Variazioni percentuali dell'area incrementale postprandiale (AI) dei trigliceridi della frazione Chilomicroni +VLDL nei 4 gruppi. $P=0.005$ per l'effetto della dieta; NS per l'effetto dell'esercizio; NS per l'effetto dell'interazione dieta x attività fisica in base modello lineare generalizzato.

L'area incrementale del colesterolo si è ridotta nei gruppi CHO/fibre (-78%) e CHO/fibre +Ex (-15%) ed è aumentata nei gruppi MUFA (25 %) e MUFA+Ex (29%). Tuttavia questa differenza non ha raggiunto la significatività statistica né per l'effetto della dieta né per l'effetto dell'attività fisica, né per l'interazione x attività fisica (Fig 3).

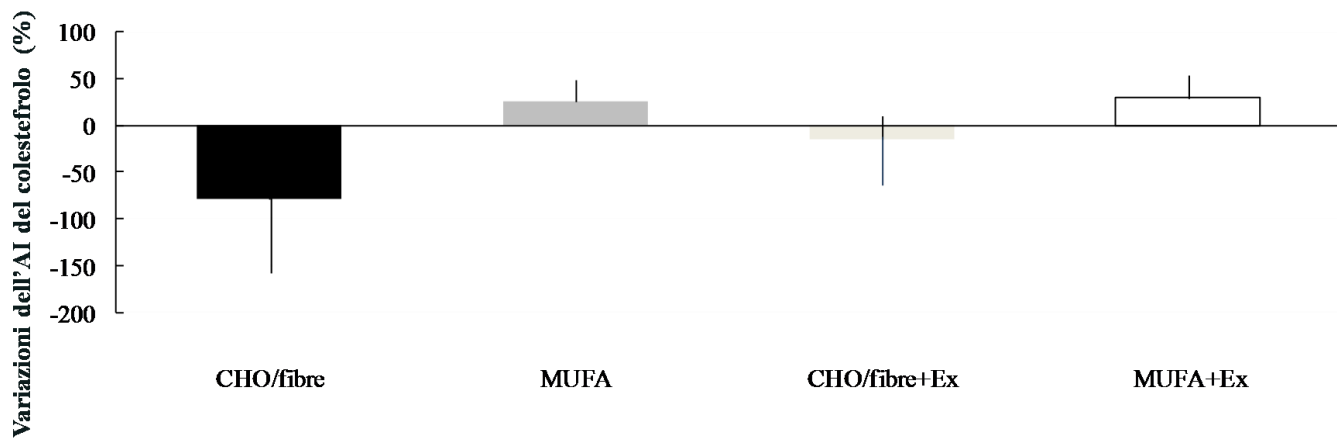


Figura 3. Variazioni percentuali dell'area incrementale postprandiale (AI) del colesterolo della frazione Chilomicroni+VLDL nei 4 gruppi. Effetto della dieta della attività fisica e dell'interazione attività fisica x dieta NS in base a modello lineare generalizzato

Correlazioni

Alla fine del trattamento le variazioni percentuali del contenuto epatico di grasso correlavano positivamente e significativamente ($r = 0.647$; $p = 0.004$) con le modifiche percentuali dell'area incrementale dei trigliceridi del plasma nei soggetti assegnati ai gruppi con dieta CHO/fibre (figura 4); le stesse variabili erano invece correlate negativamente e

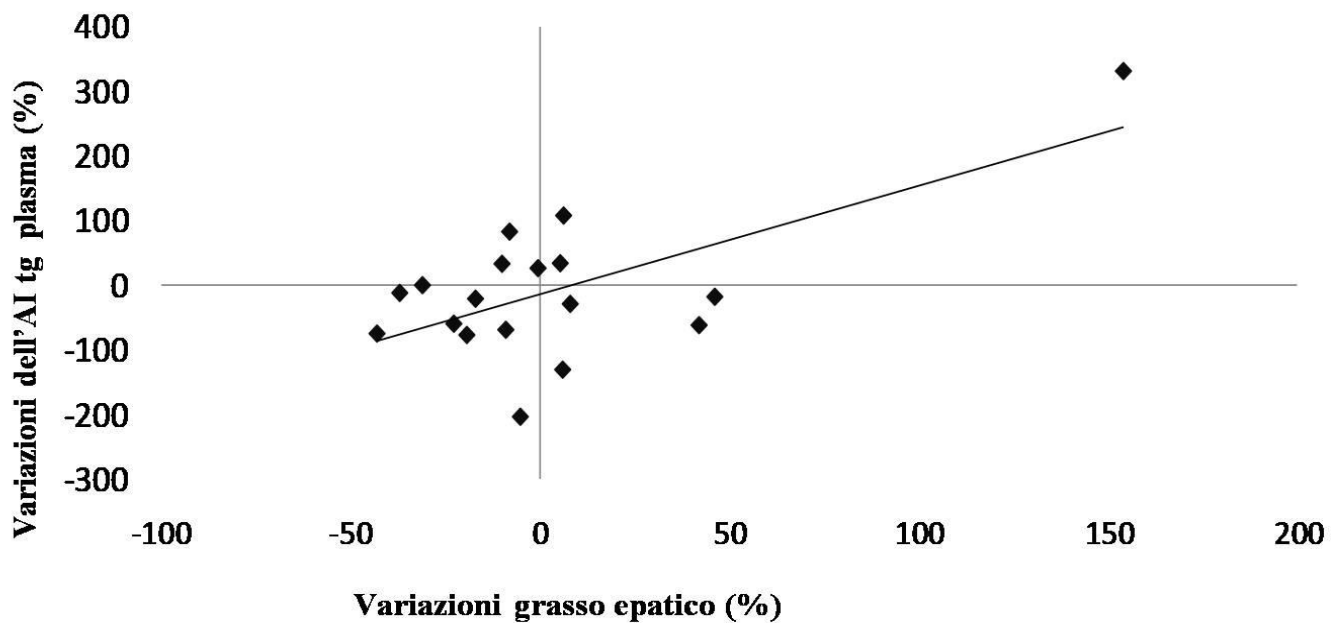


Figura 4. Correlazioni tra le variazioni del contenuto epatico di grasso e l'area incrementale dei trigliceridi del plasma dopo dieta CHO/fibre significativamente ($r = -0.588$; $p = 0.017$) nei soggetti assegnati ai gruppi con dieta MUFA (figura 5).

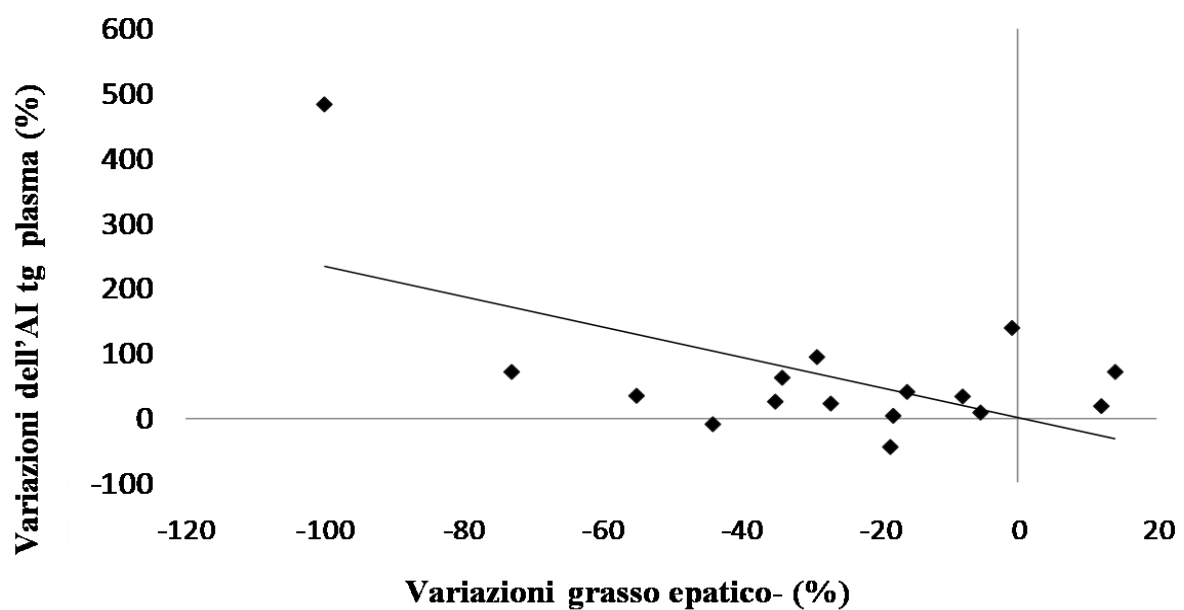


Figura 5. Correlazioni tra le variazioni del contenuto epatico di grasso e l'area incrementale dei trigliceridi del plasma dopo dieta MUFA

Discussione

Questo è il primo trial randomizzato e controllato ad aver valutato gli effetti delle modifiche qualitative della dieta e della loro interazione con l'esercizio aerobico nei pazienti con diabete mellito tipo 2, in assenza di calo ponderale, sul grasso epatico e sulla lipemia postprandiale.

In particolare abbiamo valutato gli effetti degli approcci dietetici maggiormente raccomandati per la terapia del diabete, cioè di una dieta ricca in carboidrati e fibre e a basso indice glicemico e di una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi da sole o in associazione ad un programma di attività fisica. Il contenuto epatico di grasso si è ridotto significativamente con la dieta MUFA indipendentemente dall'esercizio fisico. Ciò dimostra chiaramente che le modifiche isocaloriche della dieta possono influenzare positivamente la steatosi epatica inducendo una riduzione clinicamente significativa del contenuto epatico di grasso.

Un altro dato rilevante del nostro studio è che la qualità dei carboidrati, più che la quantità influenza la deposizione di grasso nel fegato. Infatti, mentre studi precedenti hanno ripetutamente dimostrato che il consumo di carboidrati semplici si associa ad un aumento del contenuto epatico di grasso, nel nostro studio il consumo di una dieta ricca in fibre e a basso indice glicemico non ha determinato l'aumento del grasso epatico.

Gli effetti della dieta osservati in questo studio erano indipendenti dall'esercizio. Infatti, né l'attività fisica da sola o la sua interazione con la dieta hanno influenzato il contenuto epatico di grasso. Dati precedenti in pazienti non diabetici dimostravano che l'attività fisica può determinare una riduzione di circa il 20% del contenuto epatico di grasso (100), mentre altri dimostrano che i pazienti con diabete mellito tipo 2 presentano una sorta di resistenza agli effetti benefici dell'attività fisica (155). Date tali incongruenze, sono necessari altri studi per definire il ruolo dell'attività fisica aerobica nell'accumulo epatico di grasso nel diabete tipo 2. Per quanto riguarda la lipemia postprandiale questo studio conferma i nostri dati precedenti (154) dimostrando che una dieta ricca in fibre e carboidrati e a basso indice glicemico, rispetto ad una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi migliora la risposta lipidica postprandiale.

Abbiamo osservato anche che queste modifiche della lipemia postprandiale erano in relazione con le modifiche del quantitativo di grasso ed in particolare che il tipo di dieta può modificare la direzione di questa relazione. Questa nostra osservazione crea spunto per studi futuri rivolti alla comprensione della patogenesi della steatosi epatica e al significato clinico delle alterazioni della lipemia postprandiale.

Studio 4. L'Ezetimibe influenza favorevolmente la composizione delle lipoproteine sia adigiuno che in fase postprandiale in pazienti con diabete mellito tipo 2.

(Pubblicato su Atherosclerosis, 2011; pubblicazione in estenso n° 4 in appendice)

L'Ezetimibe è un farmaco ipocolesterolemizzante che agisce attraverso l'inibizione selettiva dell'assorbimento intestinale del colesterolo (156). Oltre al ben noto effetto di questo farmaco sui livelli di colesterolo LDL, specialmente quando somministrato con una statina (157) un altro effetto rilevante connesso al suo meccanismo d'azione potrebbe essere la riduzione del contenuto in colesterolo dei chilomicroni. Inoltre, poiché l'ezetimibe riduce la disponibilità di colesterolo per la sintesi endogena delle VLDL potrebbero essere prodotte VLDL più povere in colesterolo e quindi remnants meno aterogeni. Questi effetti potenziali dell'ezetimibe sono stati scarsamente studiati.

Obiettivo

Lo scopo di questo trial randomizzato in doppio cieco è stato confrontare, per la prima volta, gli effetti di un trattamento di 6 settimane con ezetimibe 10 mg+simvastatina 20 mg (indicato come ezetimibe) con un trattamento di 6 settimane con placebo+simvastatin 20 mg (indicato oltre come placebo) sulle particelle ricche in trigliceridi di origine epatica ed intestinale sia a digiuno che in fase postprandiale in pazienti con diabete tipo 2.

Soggetti

Sono stati arruolati 15 soggetti (dodici uomini e tre donne in postmenopausa), di età media 55 ± 5 anni ($M \pm DS$), con diabete mellito tipo 2 in compenso glicemico soddisfacente ($HbA1c$ $6.6 \pm 0.7\%$), senza segni o sintomi di neuropatia iniziale o gastroparesi o qualsiasi altra complicanza del diabete, con colesterolo LDL >130 mg/dl, e trigliceridi plasmatici <400 mg/dl. Due partecipanti erano in terapia con sola dieta, 13 in terapia con dieta e metformina. Le modalità ed i dosaggi della terapia ipoglicemizzante sono rimasti immutati durante l'intera durata dello studio. I partecipanti non assumevano farmaci ipolipidizzanti e non avevano avuto modifiche del peso corporeo durante i 6 mesi precedenti lo studio.

Disegno dello studio

Lo studio è stato eseguito secondo uno disegno randomizzato in doppio cieco, cross-over. Dopo un periodo di run-in di 3 settimane, durante le quali hanno seguito la propria dieta abituale, i pazienti sono stati assegnati in modo casuale ad assumere per 6 settimane ezetimibe 10 mg + simvastatina 20 mg, o placebo + simvastatina 20 mg una volta al giorno al momento di coricarsi. In seguito, dopo un periodo di 6 settimane di washout, hanno seguito

l'altro trattamento per ulteriori 6 settimane. Le compresse sono state dati ai pazienti contenute in due scatole, una delle quali era etichettata e conteneva simvastatina 20 mg e l'altra era senza etichetta e conteneva placebo o 10 mg di ezetimibe. Il numero di compresse utilizzato è stato calcolato ad ogni visita. Composizione della dieta, il livello di attività fisica, abitudine al fumo e tutti gli altri farmaci concomitanti sono stati mantenuti invariati per tutto il periodo di studio.

All'inizio e alla fine dei due trattamenti sono stati determinate le concentrazioni a digiuno di colesterolo plasmatico e dei trigliceridi e del colesterolo HDL, e il colesterolo LDL è stato calcolato con la formula Friedewald.

Alla fine di ogni periodo di trattamento, dopo il digiuno notturno, i partecipanti hanno consumato un pasto test ricco di grassi consistente in un gateau di patate costituito da purè di patate, latte intero, uova, formaggio, prosciutto e burro (energia totale 944 kcal, carboidrati 31 % dell'energia totale, 57% grassi totali, grassi saturi il 34%, proteine 12%). Prima e dopo 2, 4 e 6 ore dal pasto sono stati prelevati campioni di sangue per la determinazione del glucosio e dell'insulina nel plasma, e di colesterolo, trigliceridi, apoB-48 e apoB-100 sia nel plasma che nelle frazioni lipoproteiche.

Risultati

Lipemia postprandiale

Chilomicroni. Il contenuto in colesterolo dei chilomicroni era significativamente minore dopo trattamento con ezetimibe rispetto al trattamento con placebo già prima del pasto e questa differenza è rimasta statisticamente significativa durante tutta la fase postprandiale ($p < 0.05$) sia a ciascun tempo che come area totale sotto la curva tAUC. I trigliceridi dei chilomicroni erano più bassi dopo ezetimibe che dopo placebo ($p < 0.05$ a digiuno e dopo 6 ore dal pasto) senza differenze significative per la tAUC (fig 1). Il rapporto colesterolo/trigliceridi era significativamente più basso dopo trattamento con ezetimibe che con placebo ($p < 0.05$ ad ogni tempo). Le concentrazioni di ApoB-100 nei chilomicroni erano indosabili a digiuno e dopo il pasto. Il contenuto in ApoB48 non era significativamente diverso a digiuno (0.005 ± 0.07 vs. 0.01 ± 0.03 mg/l) ma era più basso in fase postprandiale dopo ezetimibe che dopo placebo, raggiungendo la significatività statistica a 4 ore ($p < 0.05$) (Fig. 1). Le AUCt non erano significativamente diverse (Tabella 2). Non sono state osservate differenze significative nelle aree incrementali dei lipidi e delle apoBs.

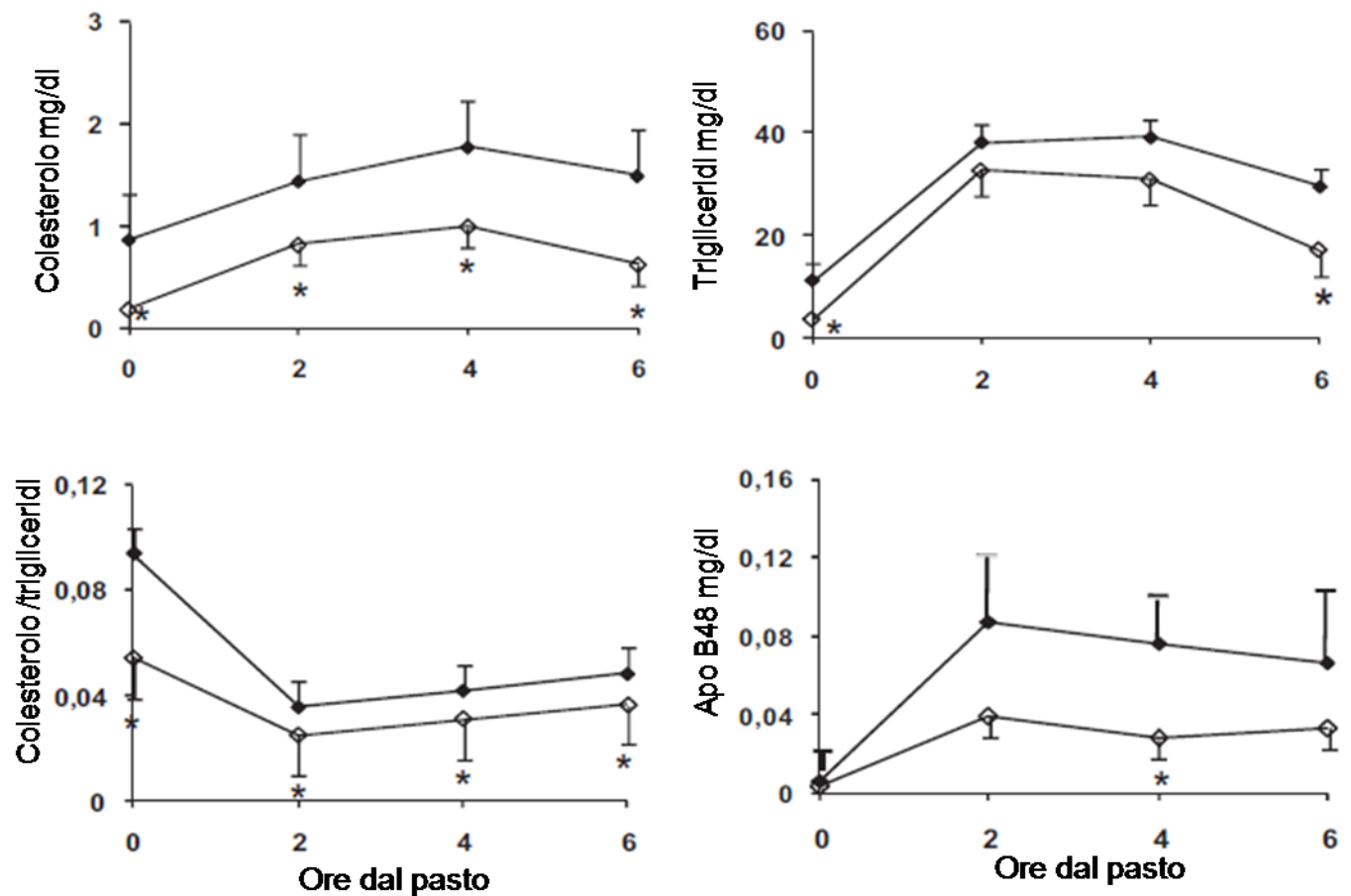


Figura 1. Concentrazioni postprandiali di colesterolo, trigliceridi, rapporto colesterolo/trigliceridi e concentrazioni di apoB48 nei chilomicroni dopo trattamento con ezetimibe (◇) e placebo (◆). ANOVA per misure ripetute $p < 0.05$ per colesterolo e rapporto colesterolo/trigliceridi; * $p < 0.05$ t-test per dati appaiati

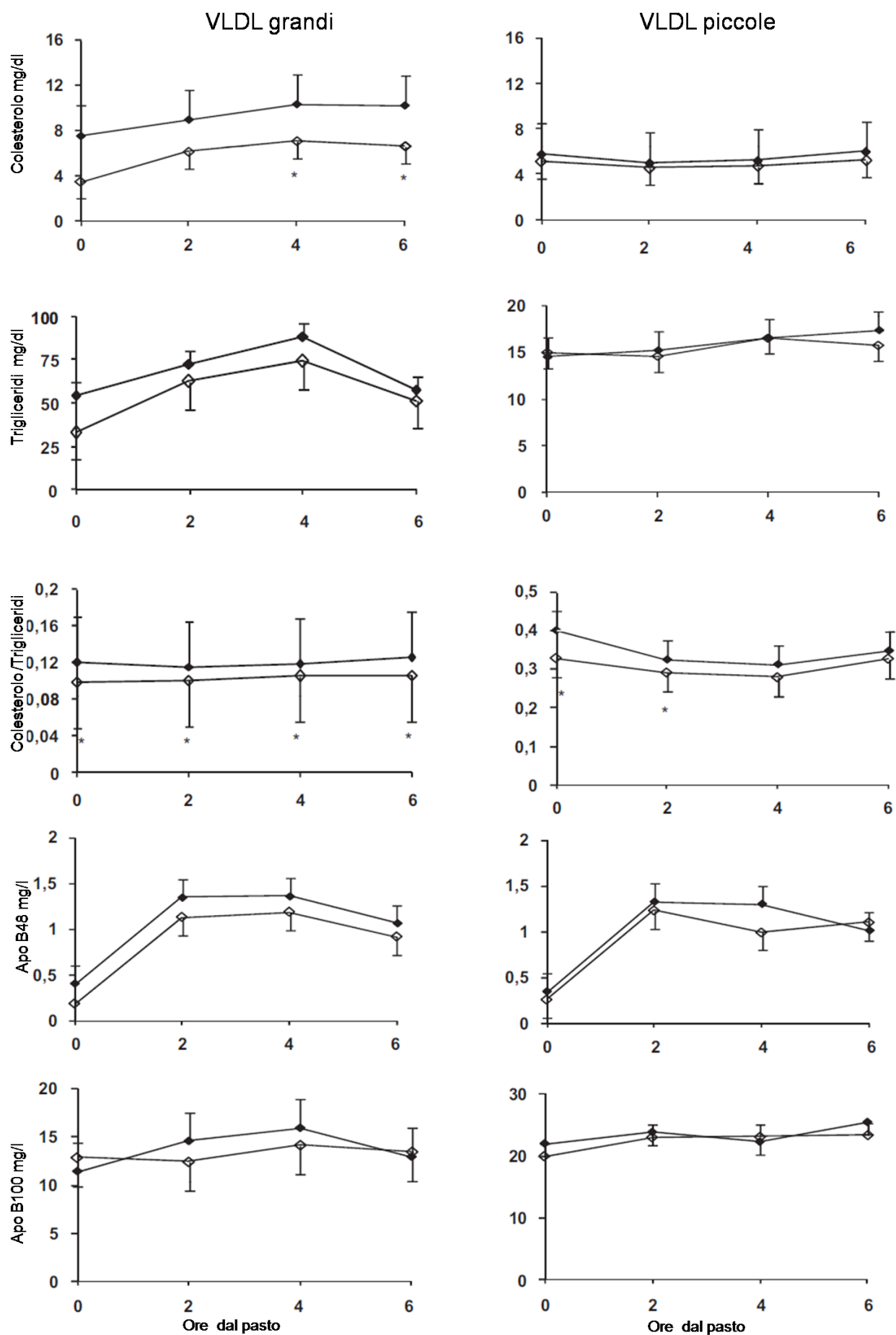


Figura 2. Colesterolo , trigliceridi, rapporto colesterolo/trigliceridi, concentrazioni di apoB-48 e apoB-100 nelle VLDL grandi e piccole con ezetimibe \diamond e placebo \bullet * p<0.05 T-test per dati appaiati

VLDL grandi. Il contenuto in colesterolo delle VLDL grandi era più basso dopo ezetimibe che dopo placebo con una differenza significativa a 4 e 6 ore dopo il pasto (Fig. 2). Le concentrazioni di trigliceridi non erano significativamente differenti (Fig. 2). Il rapporto colesterolo/trigliceridi era significativamente più basso con ezetimibe che con placebo prima del pasto e durante tutta la fase postprandiale. Le concentrazioni di ApoB-48 e apoB-100 non erano significativamente diverse alla fine di ciascun trattamento (Tabella 2). Non sono state osservate differenze significative nelle iAUC dei lipidi e delle apoBs.

VLDL piccole. I lipidi e le apoproteine B nelle VLDL piccole non erano diverse alla fine di ciascun trattamento, sia ad ogni tempo (Fig. 2) sia come aree incrementali e totali. Solo il rapporto colesterolo/trigliceridi era significativamente più basso dopo il trattamento con ezetimibe che dopo placebo a digiuno e dopo 2 ore dopo il pasto (Fig. 2).

Tabella 2

Area totale postprandiale dei lipidi (mg/dl/6h) e delle apolipoproteine B (mg/lx6h) nel plasma intero e nelle lipoproteine del plasma alla fine dei due trattamenti.

	Placebo+Simvastatina				Ezetimibe+Simvastatina			
	Colesterolo	Trigliceridi	ApoB-48	ApoB-100	Colesterolo	Trigliceridi	ApoB-48	ApoB-100
Plasma	883±134	997±634	53±44	4337±798	735±120**	885±405	43±22	3591±646**
Chilomicroni	8.3±8.8	189±155	0.43±0.54	NV	4.4±2.7*	152±82	0.20±0.20	ND
VLDL grandi	59±56	429±370	9.9±12	86±32	42±29	358±246	6.3±4.0	102±46
VLDL piccole	29±17	89±45	6.4±3.0	148±71	23±11	84±38	6.0±2.0	128±50
IDL	33±10	32±9	NM	202±53	26±11*	29±7	NM	163±55*
LDL	452±116	92±21	NM	2901±634	334±80**	89±26	NM	2297±504**
HDL	248±55	121±57	NM	NM	246±58	106±40	NM	NM

NV: non valutabile; NM: non misurato. *p<0.05 e **p<0.001 vs Placebo+Simvastatina

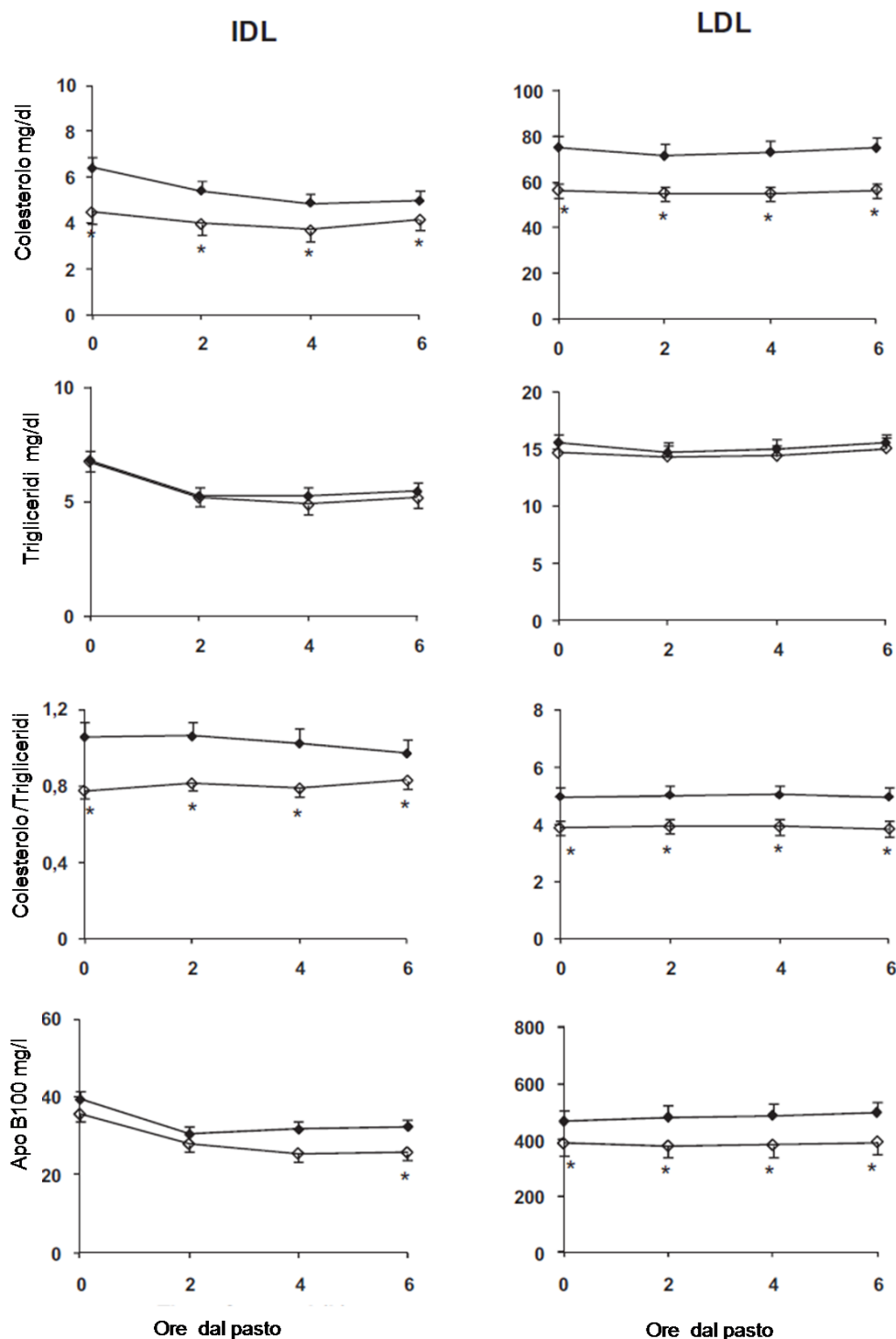


Figura 2. Colesterolo , trigliceridi, rapporto colesterolo/trigliceridi, concentrazioni di e apoB-100 nelle IDL e LDL con ezetimibe \diamond e placebo \blacklozenge * $p < 0.05$ T-test per dati appaiati

IDL. Il contenuto in colesterolo era significativamente più basso dopo il trattamento con ezetimibe che con placebo a digiuno e ad ogni tempo dopo il pasto meal ($p < 0.05$) (Fig. 3) con una tAUC significativamente più bassa (Table 2). Come conseguenza della riduzione del contenuto in colesterolo il rapporto colesterolo/trigliceridi era significativamente ridotto dopo ezetimibe che dopo placebo a digiuno e durante tutta la fase postprandiale (Fig. 3). Le

concentrazioni di ApoB-100 erano minori dopo ezetimibe ($p < 0.05$ at 6 hours) (Fig. 3) con una riduzione significativa anche della tAUC (Table 2). Non sono state osservate differenze significative nelle iAUC dei lipidi e delle apoBs.

LDL. Il contenuto in colesterolo e apoB-100 oltre che il rapporto colesterolo/trigliceridi nelle LDL era significativamente più basso dopo ezetimibe a digiuno e ad ogni singolo punto della curva (Fig. 3) con una riduzione significativa della the tAUC (Table 2).

Discussione

Questo trial randomizzato in doppio cieco in pazienti con diabete mellito tipo 2 mostra che un trattamento di 6 settimane con ezetimibe+simvastatina rispetto al placebo+simvastatina, oltre i ben noti effetti sul colesterolo LDL ed il contenuto in apoB100, ha ulteriori effetti benefici sulle lipoproteine a digiuno ed in fase postprandiale. Infatti, l'ezetimibe ha determinato a) la riduzione del contenuto in lipidi dei chilomicroni in particolare del colesterolo, sia s digiuno che dopo il pasto, suggerendo che vengono prodotti chilomicroni più poveri in colesterolo (b) la riduzione del numero dei chilomicroni circolanti, come mostrato dai livelli ridotti di apo B48 in fase postprandiale e (c) a la riduzione del contenuto in colesterolo delle VLDL grandi, che suggerisce che viene prodotto un numero ridotto di remnants dei chilomicroni e delle lipoproteine di origine epatica. Tutti questi effetti possono contribuire ad un profilo lipidico potenzialmente meno aterogeno. Infatti, un numero ridotto di lipoproteine di origine intestinale, per di più povere di colesterolo, potrebbero avere un impatto minore sull'aterogenesi (54).

Questa è la prima volta che uno studio di intervento controllato riporta questi effetti sulla lipemia postprandiale in pazienti con diabete mellito tipo 2. Ciò è clinicamente rilevante in quanto questi pazienti sono caratterizzati da anomalie del metabolismo postprandiale delle lipoproteine che possono contribuire al loro maggior profilo di rischio cardiovascolare. Gli effetti benefici osservati dopo il trattamento con ezetimibe sia a digiuno che in fase postprandiale sono in relazione al meccanismo d'azione del farmaco e alla fisiologia dell'assorbimento intestinale del colesterolo. Infatti l'ezetimibe inibisce il trasferimento di colesterolo dal lume intestinale agli enterociti, agendo sulla trasportatore di Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) (156). Il fatto che gli effetti ezetimibe, nel nostro studio, erano presenti non solo nel periodo postprandiale, ma anche a digiuno sono probabilmente conseguenti alle caratteristiche fisiologiche di assorbimento intestinale del colesterolo. Dopo un pasto, il colesterolo alimentare che raggiunge il lume intestinale è captato dall'orletto a spazzola degli enterociti ed è solo lentamente escreto nei chilomicroni. Ciò è stato dimostrato in esperimenti in soggetti sani in cui la secrezione di colesterolo alimentare nei chilomicroni non avveniva in

concomitanza con il pasto, ma si realizzava in diverse fasi successive postprandiali secondo un "modello ad onde" (158,159). Pertanto, gli effetti di ezetimibe sul contenuto in colesterolo dei chilomicroni può non essere evidente subito dopo un pasto unico, ma in diverse ore successive, dopo diversi pasti, e anche in condizioni di digiuno.

In conclusione, l'ezetimibe, al di là della ben noti effetti sul colesterolo LDL, influenza positivamente il profilo lipoproteico sia a digiuno e dopo i pasti nei pazienti con diabete di tipo 2, favorendo la produzione di chilomicroni e VLDL povere in colesterolo che sono considerate particelle meno aterogene. Gli effetti post-prandiali dell' ezetimibe sulla composizione delle lipoproteine ricche in trigliceridi riflettono principalmente gli effetti osservati a digiuno, rivelando una azione cronica di ezetimibe sull'assorbimento intestinale del colesterolo.

Studio 5. Effetti di pasti con diversi indici glicemici sulla glicemia postprandiale in pazienti con diabete mellito tipo 1 trattati mediante microinfusore di insulina.

(Pubblicato su Diabetic Medicin, 2010; pubblicazione in estenso n° 5 in appendice)

Fattori legati alla dieta, in particolare i carboidrati, influenzano le escursioni glicemiche postprandiali nei pazienti con diabete mellito (160).

I metodi attualmente raccomandati per la determinazione della dose preprandiale di insulina tengono conto della quantità ma non della qualità dei carboidrati

Obiettivo

Valutare l'impatto di pasti ad alto e a basso indice glicemico sulla glicemia postprandiale in pazienti con diabete tipo 1 in terapia con microinfusore di insulina.

Disegno dello studio

Sedici pazienti con diabete di tipo 1 in terapia con infusione sottocutanea di insulina in continuo da più di 1 anno, con età media 36 anni, IMC $24,6 \pm 0,2 \text{ kg/m}^2$, durata del diabete 14 ± 2 anni, HbA1c $7,6 \pm 0,2\%$, sono stati reclutati presso l'ambulatorio di diabetologia dell'Università Federico II.

In due diverse occasioni, ad 1 settimana di distanza, i pazienti hanno consumato, in ordine casuale, due pasti test con composizione identica dei principali nutrienti (circa 100 g di carboidrati, 28 g di grassi, proteine 38 g, 12 g di fibre, c. 790 kcal), ma con diverso indice glicemico: 59 o 90. I pasti sono preparati nella cucina metabolica e sono stati consumati nello stesso momento della giornata (12.30 h) nelle due occasioni. Il pasto con carboidrati a basso indice glicemico, era composto principalmente da legumi e pasta, mentre il pasto con carboidrati ad alto indice glicemico conteneva pane e riso. La mattina del test, i soggetti hanno consumato la stessa colazione standardizzata, e si sono astenuti dall'effettuare esercizio fisico intenso nelle precedenti 24 ore. Tutti i soggetti utilizzavano analoghi ultrarapidi dell'insulina. L'infusione di insulina basale e i boli preprandiali sono stati mantenuti costanti nelle due occasioni. Il bolo preprandiale è stato calcolato sulla base dei carboidrati contenuti nel pasto ed è stato corretto per la sensibilità all'insulina di ogni soggetto.

Prima del pasto test e ogni 30 minuti per 180 minuti è stata misurata la glicemia su sangue capillare utilizzando uno riflettometro (Accu-Chek, Roche, Mannheim, Germania).

Statistica

I dati sono espressi come media±errore standard. Le differenze complessive tra i due pasti test sono state valutate mediante ANOVA per misure ripetute. Le differenze di glicemia a ciascun tempo sono state valutate mediante t-test di Student per dati appaiati corretto per il confronto multiplo (Bonferroni).

Risultati

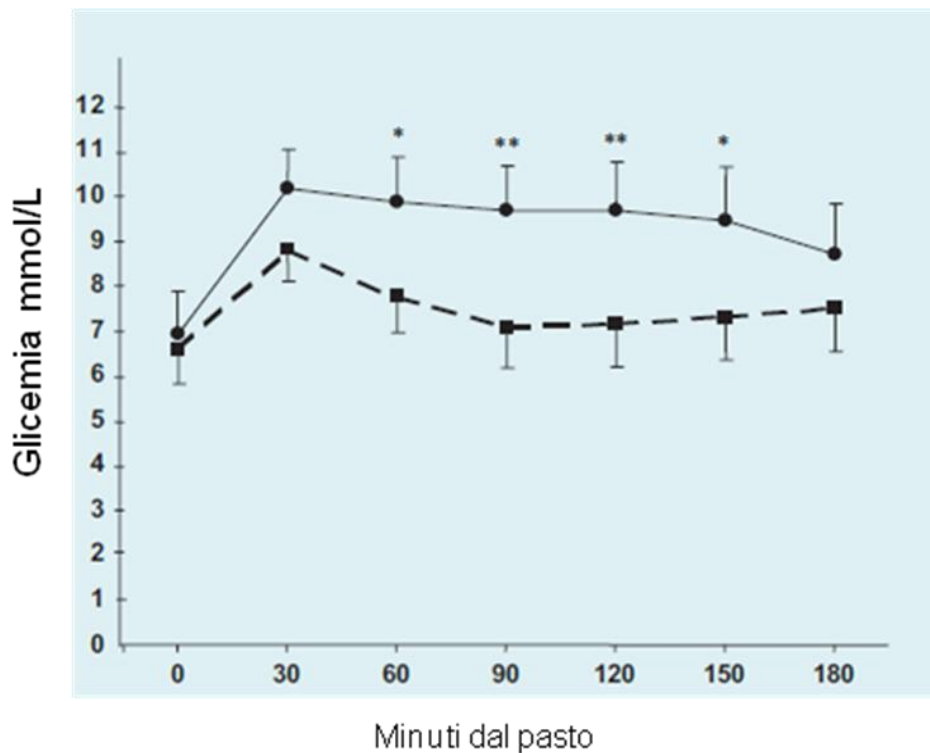


Figura 1 Glicemia dopo un pasto a basso (---) e alto (—) indice glicemico; M± ES; * p<0.05 ** P < 0.001, vs. pasto a basso indice glicemico

Il bolo di insulina preprandiale era 5.6 ± 0.2 UI (range 4.0–8.0 UI). La glicemia capillare prima del pasto test era simile nelle due occasioni (pasto ad alto indice glicemico 130 ± 12.6 e pasto a basso indice glicemico 126 ± 13 ; P= n.s.). I profili glicemici dopo i due pasti sono mostrati nella figura 1. I livelli di glicemia dopo il pasto a basso indice glicemico erano significativamente più bassi rispetto a quelli successivi al pasto ad alto indice glicemico, con una differenza compresa tra 36 e 45 mg/dl ai minuti 60-150 ($P < 0.05-0.01$). L'area sotto la curva totale era 25182 ± 2160 *180 minuti dopo il pasto a basso indice glicemico e 31626 ± 2214 *180 minuti dopo il pasto ad alto indice glicemico ($P=0.006$).

Discussione:

I nostri dati mostrano che pasti con lo stesso contenuto di carboidrati ma con diversi indici glicemici determinano differenze clinicamente significative nella glicemia postprandiale di pazienti in terapia insulinica mediante microinfusore di insulina. In particolare, la risposta glicemica al pasto a basso indice glicemico è stata del 20% inferiore a quello del pasto ad alto indice glicemico. I nostri risultati mostrano che il conteggio dei carboidrati non può essere affidabile quando le abitudini alimentari sono caratterizzate da ampie variazioni nella qualità dei carboidrati. Pertanto, nuovi metodi per il calcolo delle dosi preprandiali di insulina che tengano anche conto anche dell'indice glicemico dei pasti, sarebbero di grande utilità clinica.

CONCLUSIONI

1. Nei pazienti con diabete tipo 2 e dislipidemia postprandiale vi è un aumento del contenuto epatico di grasso, indipendentemente da obesità e insulino-resistenza sistemica. Tale aumento del grasso epatico potrebbe essere il risultato di un'alterata distribuzione regionale del grasso, secondaria ad una inadeguata capacità di deposito da parte del tessuto adiposo sottocutaneo.
2. Una dieta relativamente ricca in carboidrati, ricca in fibre e a basso indice glicemico influenza positivamente le alterazioni lipidiche postprandiali, presenti nel diabete tipo 2.
3. Una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi riduce il contenuto epatico di grasso nei pazienti con diabete tipo 2. Un periodo di training aerobico associato ad un intervento di variazioni qualitative della dieta non influenza né la lipemia postprandiale né il contenuto epatico di grasso in pazienti con diabete tipo 2.
4. L'ezetimibe influenza positivamente il profilo lipoproteico sia a digiuno che in fase postprandiale in pazienti con diabete tipo 2 favorendo la produzione di chilomicroni e VLDL poveri in colesterolo e pertanto potenzialmente meno aterogeni.
5. L'indice glicemico del pasto influenza positivamente la risposta glicemica in pazienti con diabete mellito tipo 1 in trattamento con microinfusore di insulina, per cui andrebbe considerato nella determinazione del dosaggio insulinico preprandiale.

BIBLIOGRAFIA

1. Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A: Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest* 91:748-758, 1993
2. Taskinen MR: Pathogenesis of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2:S180-S188, 2001
3. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP: Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 95:69-75, 1997
4. Havel RJ: Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 5:102-109, 1994
5. Syvanne M, Taskinen MR: Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 350 Suppl 1:SI20-SI23, 1997
6. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A: Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:201-229, 2002
7. Despres JP, Lemieux I, Prud'homme D: Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ* 322:716-720, 2001
8. Montague CT, O'Rahilly S: The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49:883-888, 2000
9. Frayn KN: Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *Br J Nutr* 83 Suppl 1:S71-S77, 2000
10. Montague CT, O'Rahilly S: The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49:883-888, 2000
11. Misra A, Garg A, Abate N, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Grundy SM: Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men. *Obes Res* 5:93-99, 1997
12. Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Adams-Huet B, Grundy SM: Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM. *Diabetes* 45:1684-1693, 1996
13. Kahn BB, Flier JS: Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481, 2000
14. Parker DR, Carlisle K, Cowan FJ, Corrall RJ, Read AE: Postprandial mesenteric blood flow in humans: relationship to endogenous gastrointestinal

- hormone secretion and energy content of food. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7:435-440, 1995
15. Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriege P, Despres JP: Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* 47:953-960, 1998
 16. Ryu JE, Craven TE, MacArthur RD, Hinson WH, Bond MG, Hagaman AP, Crouse JR, III: Relationship of intraabdominal fat as measured by magnetic resonance imaging to postprandial lipemia in middle-aged subjects. *Am J Clin Nutr* 60:586-591, 1994
 17. Blackburn P, Lamarche B, Couillard C, Pascot A, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I, Despres JP: Contribution of visceral adiposity to the exaggerated postprandial lipemia of men with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 26:3303-3309, 2003
 18. Gallagher D, Kelley DE, Yim JE, Spence N, Albu J, Boxt L, Pi-Sunyer FX, Heshka S: Adipose tissue distribution is different in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 89:807-814, 2009
 19. Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556, 2004
 20. Havel PJ: Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53 Suppl 1:S143-S151, 2004
 21. Kantartzis K, Fritsche A, Tschritter O, Thamer C, Haap M, Schafer S, Stumvoll M, Haring HU, Stefan N: The association between plasma adiponectin and insulin sensitivity in humans depends on obesity. *Obes Res* 13:1683-1691, 2005
 22. Annuzzi G, Bozzetto L, Patti L, Santangelo C, Giacco R, Di ML, De NC, Masella R, Riccardi G, Rivellese AA: Type 2 diabetes mellitus is characterized by reduced postprandial adiponectin response: a possible link with diabetic postprandial dyslipidemia. *Metabolism* 59:567-574, 2010
 23. Annuzzi G, Piscitelli F, Di ML, Patti L, Giacco R, Costabile G, Bozzetto L, Riccardi G, Verde R, Petrosino S, Rivellese AA, Di M, V: Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients. *Lipids Health Dis* 9:43, 2010
 24. Lewis GF: Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol* 8:146-153, 1997
 25. Wahren J, Sato Y, Ostman J, Hagenfeldt L, Felig P: Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-dependent diabetics at rest and in response to exercise. *J Clin Invest* 73:1367-1376, 1984
 26. Basso LV, Havel RJ: Hepatic metabolism of free fatty acids in normal and diabetic dogs. *J Clin Invest* 49:537-547, 1970
 27. Angulo P: Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346:1221-1231, 2002

28. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N: Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107:450-455, 1999
29. Korshennikova E, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, Virkamaki A: Elevated fasting insulin concentrations associate with impaired insulin signaling in skeletal muscle of healthy subjects independent of obesity. *Diabetes Metab Res Rev* 18:209-216, 2002
30. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G: Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 42:987-1000, 2005
31. Luyckx FH, Desai C, Thiry A, Dewe W, Scheen AJ, Gielen JE, Lefebvre PJ: Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:222-226, 1998
32. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N: Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50:1844-1850, 2001
33. Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RA, Kuller LH, Kalhan SC: Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E906-E916, 2003
34. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H: Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 31:165-169, 2008
35. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H: Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3023-3028, 2002
36. Westerbacka J, Corner A, Tiikkainen M, Tamminen M, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Fredriksson J, Yki-Jarvinen H: Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex differences in markers of cardiovascular risk. *Diabetologia* 47:1360-1369, 2004
37. Yki-Jarvinen H: Fat in the liver and insulin resistance. *Ann Med* 37:347-356, 2005
38. Blackburn P, Cote M, Lamarche B, Couillard C, Pascot A, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I, Despres JP: Impact of postprandial variation in triglyceridemia on low-density lipoprotein particle size. *Metabolism* 52:1379-1386, 2003
39. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, Hakkinen A, Olofsson SO, Yki-Jarvinen H,

- Boren J: Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 49:755-765, 2006
40. Schaefer EJ, McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Ordovas JM, Wilson PW: Elevated remnant-like particle cholesterol and triglyceride levels in diabetic men and women in the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 25:989-994, 2002
 41. Curtin A, Deegan P, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH: Elevated triglyceride-rich lipoproteins in diabetes. A study of apolipoprotein B-48. *Acta Diabetol* 33:205-210, 1996
 42. Adeli K, Lewis GF: Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol* 19:221-228, 2008
 43. Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P: Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *J Lipid Res* 48:1336-1342, 2007
 44. Taggart C, Gibney J, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH: The role of dietary cholesterol in the regulation of postprandial apolipoprotein B48 levels in diabetes. *Diabet Med* 14:1051-1058, 1997
 45. Tomkin GH: The intestine as a regulator of cholesterol homeostasis in diabetes. *Atheroscler Suppl* 9:27-32, 2008
 46. Ciofetta M, Lalli C, Del SP, Torlone E, Pampanelli S, Mauro L, Chiara DL, Brunetti P, Bolli GB: Contribution of postprandial versus interprandial blood glucose to HbA1c in type 1 diabetes on physiologic intensive therapy with lispro insulin at mealtime. *Diabetes Care* 22:795-800, 1999
 47. Bolli GB, Di Marchi RD, Park GD, Pramming S, Koivisto VA: Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:1151-1167, 1999
 48. Valla V: Therapeutics of diabetes mellitus: focus on insulin analogues and insulin pumps. *Exp Diabetes Res* 2010:178372, 2010
 49. Perrotti N, Santoro D, Genovese S, Giacco A, Rivellesse A, Riccardi G: Effect of digestible carbohydrates on glucose control in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 7:354-359, 1984
 50. Rabasa-Lhoret R, Garon J, Langelier H, Poisson D, Chiasson JL: Effects of meal carbohydrate content on insulin requirements in type 1 diabetic patients treated intensively with the basal-bolus (ultralente-regular) insulin regimen. *Diabetes Care* 22:667-673, 1999
 51. Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A, Holzmeister LA, Hoogwerf B, Mayer-Davis E, Mooradian AD, Purnell JQ, Wheeler M: Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care* 26 Suppl 1:S51-S61, 2003

52. THOMAS JE: Mechanics and regulation of gastric emptying. *Physiol Rev* 37:453-474, 1957
53. Gannon MC, Nuttall JA, Damberg G, Gupta V, Nuttall FQ: Effect of protein ingestion on the glucose appearance rate in people with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1040-1047, 2001
54. Mero N, Malmstrom R, Steiner G, Taskinen MR, Syvanne M: Postprandial metabolism of apolipoprotein B-48- and B-100-containing particles in type 2 diabetes mellitus: relations to angiographically verified severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 150:167-177, 2000
55. Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, Miller H, Charach G, Rotmensch HH, Liron M, Rubinstein A, Iaina A: Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *BMJ* 312:935-939, 1996
56. Lupattelli G, Pasqualini L, Siepi D, Marchesi S, Pirro M, Vaudo G, Ciuffetti G, Mannarino E: Increased postprandial lipemia in patients with normolipemic peripheral arterial disease. *Am Heart J* 143:733-738, 2002
57. Ryu JE, Howard G, Craven TE, Bond MG, Hagaman AP, Crouse JR, III: Postprandial triglyceridemia and carotid atherosclerosis in middle-aged subjects. *Stroke* 23:823-828, 1992
58. Sharrett AR, Chambless LE, Heiss G, Paton CC, Patsch W: Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate responses with asymptomatic carotid artery atherosclerosis in middle-aged men and women. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:2122-2129, 1995
59. Boquist S, Ruotolo G, Tang R, Bjorkegren J, Bond MG, de FU, Karpe F, Hamsten A: Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation* 100:723-728, 1999
60. Teno S, Uto Y, Nagashima H, Endoh Y, Iwamoto Y, Omori Y, Takizawa T: Association of postprandial hypertriglyceridemia and carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23:1401-1406, 2000
61. Karpe F, de FU, Mercuri M, Bond MG, Hellenius ML, Hamsten A: Magnitude of alimentary lipemia is related to intima-media thickness of the common carotid artery in middle-aged men. *Atherosclerosis* 141:307-314, 1998
62. Williams CM: Postprandial lipid metabolism: effects of dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc* 56:679-692, 1997
63. Lichtenstein AH, Ausman LM, Carrasco W, Jenner JL, Gualtieri LJ, Goldin BR, Ordovas JM, Schaefer EJ: Effects of canola, corn, and olive oils on fasting and postprandial plasma lipoproteins in humans as part of a National Cholesterol Education Program Step 2 diet. *Arterioscler Thromb* 13:1533-1542, 1993

64. Tholstrup T, Sandstrom B, Bysted A, Holmer G: Effect of 6 dietary fatty acids on the postprandial lipid profile, plasma fatty acids, lipoprotein lipase, and cholesterol ester transfer activities in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 73:198-208, 2001
65. Silveira A, Karpe F, Johnsson H, Bauer KA, Hamsten A: In vivo demonstration in humans that large postprandial triglyceride-rich lipoproteins activate coagulation factor VII through the intrinsic coagulation pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1333-1339, 1996
66. Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K: Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 77:605-611, 2003
67. Mekki N, Charbonnier M, Borel P, Leonardi J, Juhel C, Portugal H, Lairon D: Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effects on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men. *J Nutr* 132:3642-3649, 2002
68. Weintraub MS, Zechner R, Brown A, Eisenberg S, Breslow JL: Dietary polyunsaturated fats of the W-6 and W-3 series reduce postprandial lipoprotein levels. Chronic and acute effects of fat saturation on postprandial lipoprotein metabolism. *J Clin Invest* 82:1884-1893, 1988
69. Park Y, Harris WS: Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res* 44:455-463, 2003
70. Annuzzi G, De NC, Iovine C, Patti L, Di ML, Coppola S, Del PS, Riccardi G, Rivellese AA: Insulin resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2397-2402, 2004
71. Miller GJ, Martin JC, Mitropoulos KA, Reeves BE, Thompson RL, Meade TW, Cooper JA, Cruickshank JK: Plasma factor VII is activated by postprandial triglyceridaemia, irrespective of dietary fat composition. *Atherosclerosis* 86:163-171, 1991
72. Steiner G: Hypertriglyceridemia and carbohydrate intolerance: interrelations and therapeutic implications. *Am J Cardiol* 57:27G-30G, 1986
73. Nestel PJ, Carroll KF, Havenstein N: Plasma triglyceride response to carbohydrates, fats and caloric intake. *Metabolism* 19:1-18, 1970
74. Rodriguez-Villar C, Manzanares JM, Casals E, Perez-Heras A, Zambon D, Gomis R, Ros E: High-monounsaturated fat, olive oil-rich diet has effects similar to a high-carbohydrate diet on fasting and postprandial state and metabolic profiles of patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 49:1511-1517, 2000
75. Campbell LV, Marmot PE, Dyer JA, Borkman M, Storlien LH: The high-monounsaturated fat diet as a practical alternative for NIDDM. *Diabetes Care* 17:177-182, 1994

76. Chen YD, Coulston AM, Zhou MY, Hollenbeck CB, Reaven GM: Why do low-fat high-carbohydrate diets accentuate postprandial lipemia in patients with NIDDM? *Diabetes Care* 18:10-16, 1995
77. Georgopoulos A, Bantle JP, Noutsou M, Swaim WR, Parker SJ: Differences in the metabolism of postprandial lipoproteins after a high-monounsaturated-fat versus a high-carbohydrate diet in patients with type 1 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:773-782, 1998
78. Ikeda I, Tomari Y, Sugano M: Interrelated effects of dietary fiber and fat on lymphatic cholesterol and triglyceride absorption in rats. *J Nutr* 119:1383-1387, 1989
79. Ripsin CM, Keenan JM, Jacobs DR, Jr., Elmer PJ, Welch RR, Van HL, Liu K, Turnbull WH, Thye FW, Kestin M, .: Oat products and lipid lowering. A meta-analysis. *JAMA* 267:3317-3325, 1992
80. Anderson JW, Tietzen-Clark J: Dietary fiber: hyperlipidemia, hypertension, and coronary heart disease. *Am J Gastroenterol* 81:907-919, 1986
81. Glore SR, Van TD, Knehans AW, Guild M: Soluble fiber and serum lipids: a literature review. *J Am Diet Assoc* 94:425-436, 1994
82. Lairon D: Dietary fibres: effects on lipid metabolism and mechanisms of action. *Eur J Clin Nutr* 50:125-133, 1996
83. Cherbut C: Role of gastrointestinal motility in the delay of absorption by dietary fibre. *Eur J Clin Nutr* 49 Suppl 3:S74-S80, 1995
84. Mekki N, Dubois C, Charbonnier M, Cara L, Senft M, Pauli AM, Portugal H, Gassin AL, Lafont H, Lairon D: Effects of lowering fat and increasing dietary fiber on fasting and postprandial plasma lipids in hypercholesterolemic subjects consuming a mixed Mediterranean-Western diet. *Am J Clin Nutr* 66:1443-1451, 1997
85. Dubois C, Armand M, Senft M, Portugal H, Pauli AM, Bernard PM, Lafont H, Lairon D: Chronic oat bran intake alters postprandial lipemia and lipoproteins in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 61:325-333, 1995
86. Anderson JW, O'Neal DS, Riddell-Mason S, Floore TL, Dillon DW, Oeltgen PR: Postprandial serum glucose, insulin, and lipoprotein responses to high- and low-fiber diets. *Metabolism* 44:848-854, 1995
87. Vitola BE, Deivanayagam S, Stein RI, Mohammed BS, Magkos F, Kirk EP, Klein S: Weight loss reduces liver fat and improves hepatic and skeletal muscle insulin sensitivity in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 17:1744-1748, 2009
88. Huang MA, Greenson JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, Emick D, Lok AS, Conjeevaram HS: One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 100:1072-1081, 2005

89. Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Jarvinen H: Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2804-2809, 2005
90. Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, Choi JB, Watada H, Niwa M, Kinoshita J, Ooka A, Kumashiro N, Igarashi Y, Kyogoku S, Maehara T, Kawasumi M, Hirose T, Kawamori R: Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3191-3196, 2005
91. Valtuena S, Pellegrini N, Ardigo D, Del RD, Numeroso F, Scazzina F, Monti L, Zavaroni I, Brighenti F: Dietary glycemic index and liver steatosis. *Am J Clin Nutr* 84:136-142, 2006
92. Gill JM, Al-Mamari A, Ferrell WR, Cleland SJ, Sattar N, Packard CJ, Petrie JR, Caslake MJ: Effects of a moderate exercise session on postprandial lipoproteins, apolipoproteins and lipoprotein remnants in middle-aged men. *Atherosclerosis* 185:87-96, 2006
93. Pfeiffer M, Ludwig T, Wenk C, Colombani PC: The influence of walking performed immediately before meals with moderate fat content on postprandial lipemia. *Lipids Health Dis* 4:24, 2005
94. Gill JM, Al-Mamari A, Ferrell WR, Cleland SJ, Perry CG, Sattar N, Packard CJ, Caslake MJ, Petrie JR: Effect of prior moderate exercise on postprandial metabolism in men with type 2 diabetes: heterogeneity of responses. *Atherosclerosis* 194:134-143, 2007
95. Tobin LW, Kiens B, Galbo H: The effect of exercise on postprandial lipidemia in type 2 diabetic patients. *Eur J Appl Physiol* 102:361-370, 2008
96. Gill JM, Caslake MJ, McAllister C, Tsofliou F, Ferrell WR, Packard CJ, Malkova D: Effects of short-term detraining on postprandial metabolism, endothelial function, and inflammation in endurance-trained men: dissociation between changes in triglyceride metabolism and endothelial function. j.gill@bio.gla.ac.uk. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4328-4335, 2003
97. Herd SL, Lawrence JE, Malkova D, Murphy MH, Mastana S, Hardman AE: Postprandial lipemia in young men and women of contrasting training status. *J Appl Physiol* 89:2049-2056, 2000
98. Alam S, Stolinski M, Pentecost C, Boroujerdi MA, Jones RH, Sonksen PH, Umpleby AM: The effect of a six-month exercise program on very low-density lipoprotein apolipoprotein B secretion in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:688-694, 2004
99. Zelber-Sagi S, Ratzin V, Oren R: Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 17:3377-3389, 2011

100. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J: Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 50:1105-1112, 2009
101. Weintraub MS, Charach G, Grosskopf I: Effects of fibric acid derivatives and metformin on postprandial lipemia. *Atherosclerosis* 141 Suppl 1:S71-S75, 1998
102. Attia N, Durlach V, Cambilleau M, Roche D, Girard-Globa A: Postprandial concentrations and distribution of apo C-III in type 2 diabetic patients. Effect Of bezafibrate treatment. *Atherosclerosis* 149:427-433, 2000
103. Syvanne M, Vuorinen-Markkola H, Hilden H, Taskinen MR: Gemfibrozil reduces postprandial lipemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb* 13:286-295, 1993
104. Simpson HS, Williamson CM, Olivecrona T, Pringle S, Maclean J, Lorimer AR, Bonnefous F, Bogaievsky Y, Packard CJ, Shepherd J: Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 85:193-202, 1990
105. Autran D, Attia N, Dedecjus M, Durlach V, Girard-Globa A: Postprandial reverse cholesterol transport in type 2 diabetic patients: effect of a lipid lowering treatment. *Atherosclerosis* 153:453-460, 2000
106. Sheu WH, Jeng CY, Lee WJ, Lin SY, Pei D, Chen YT: Simvastatin treatment on postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes mellitus patients with combined hyperlipidemia. *Metabolism* 50:355-359, 2001
107. Costa A, Casamitjana R, Casals E, Alvarez L, Morales J, Masramon X, Hernandez G, Gomis R, Conget I: Effects of atorvastatin on glucose homeostasis, postprandial triglyceride response and C-reactive protein in subjects with impaired fasting glucose. *Diabet Med* 20:743-745, 2003
108. Nordoy A, Hansen JB, Brox J, Svensson B: Effects of atorvastatin and omega-3 fatty acids on LDL subfractions and postprandial hyperlipemia in patients with combined hyperlipemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11:7-16, 2001
109. Simo IE, Yakichuk JA, Ooi TC: Effect of gemfibrozil and lovastatin on postprandial lipoprotein clearance in the hypoalphalipoproteinemia and hypertriglyceridemia syndrome. *Atherosclerosis* 100:55-64, 1993
110. Wilmink HW, Twickler MB, Banga JD, Dallinga-Thie GM, Eeltink H, Erkelens DW, Rabelink TJ, Stroes ES: Effect of statin versus fibrate on postprandial endothelial dysfunction: role of remnant-like particles. *Cardiovasc Res* 50:577-582, 2001
111. Zheng S, Hoos L, Cook J, Tetzloff G, Davis H, Jr., van HM, Hwa JJ: Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Eur J Pharmacol* 584:118-124, 2008
112. Kastelein JJ, Akdim F, Stroes ES, Zwinderman AH, Bots ML, Stalenhoef AF, Visseren FL, Sijbrands EJ, Trip MD, Stein EA, Gaudet D, Duivenvoorden R,

- Veltri EP, Marais AD, de GE: Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 358:1431-1443, 2008
113. Klein R, Moss S: A comparison of the study populations in the Diabetes Control and Complications Trial and the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Arch Intern Med* 155:745-754, 1995
 114. Delahanty LM, Halford BN: The role of diet behaviors in achieving improved glycemic control in intensively treated patients in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 16:1453-1458, 1993
 115. Nansel TR, Gellar L, McGill A: Effect of varying glycemic index meals on blood glucose control assessed with continuous glucose monitoring in youth with type 1 diabetes on basal-bolus insulin regimens. *Diabetes Care* 31:695-697, 2008
 116. Rovner AJ, Nansel TR, Gellar L: The effect of a low-glycemic diet vs a standard diet on blood glucose levels and macronutrient intake in children with type 1 diabetes. *J Am Diet Assoc* 109:303-307, 2009
 117. Brand-Miller JC, Petocz P, Colagiuri S: Meta-analysis of low-glycemic index diets in the management of diabetes: response to Franz. *Diabetes Care* 26:3363-3364, 2003
 118. Kawamura T: The importance of carbohydrate counting in the treatment of children with diabetes. *Pediatr Diabetes* 8 Suppl 6:57-62, 2007
 119. Hui LL, Nelson EA, Choi KC, Wong GW, Sung R: Twelve-hour glycemic profiles with meals of high, medium, or low glycemic load. *Diabetes Care* 28:2981-2983, 2005
 120. Ryan RL, King BR, Anderson DG, Attia JR, Collins CE, Smart CE: Influence of and optimal insulin therapy for a low-glycemic index meal in children with type 1 diabetes receiving intensive insulin therapy. *Diabetes Care* 31:1485-1490, 2008
 121. Patti L, Maffettone A, Iovine C, Marino LD, Annuzzi G, Riccardi G, Rivellese AA: Long-term effects of fish oil on lipoprotein subfractions and low density lipoprotein size in non-insulin-dependent diabetic patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 146:361-367, 1999
 122. Iovine C, Vaccaro O, Gentile A, Romano G, Pisanti F, Riccardi G, Rivellese AA: Post-prandial triglyceride profile in a population-based sample of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:19-22, 2004
 123. Iovine C, Gentile A, Hattemer A, Pacioni D, Riccardi G, Rivellese AA: Self-monitoring of plasma triglyceride levels to evaluate postprandial response to different nutrients. *Metabolism* 53:620-623, 2004
 124. Heine RJ, Dekker JM: Beyond postprandial hyperglycaemia: metabolic factors associated with cardiovascular disease. *Diabetologia* 45:461-475, 2002

125. Smith D, Proctor SD, Mamo JC: A highly sensitive assay for quantitation of apolipoprotein B48 using an antibody to human apolipoprotein B and enhanced chemiluminescence. *Ann Clin Biochem* 34 (Pt 2):185-189, 1997
126. Karpe F, Hamsten A: Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J Lipid Res* 35:1311-1317, 1994
127. Redgrave TG, Carlson LA: Changes in plasma very low density and low density lipoprotein content, composition, and size after a fatty meal in normo- and hypertriglyceridemic man. *J Lipid Res* 20:217-229, 1979
128. Bergeron N, Havel RJ: Assessment of postprandial lipemia: nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 8:43-52, 1997
129. Demacker PN: Diets and postprandial lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 6:43-47, 1995
130. Murphy MC, Conley J, Hernandez MA: Group remotivation therapy for the 90s. *Perspect Psychiatr Care* 30:9-12, 1994
131. Cohen JC: Chylomicron triglyceride clearance: comparison of three assessment methods. *Am J Clin Nutr* 49:306-313, 1989
132. Annuzzi G, Holmquist L, Carlson LA: Concentrations of apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III, E and lipids in serum and serum lipoproteins of normal subjects during alimentary lipaemia. *Scand J Clin Lab Invest* 49:73-81, 1989
133. Annuzzi G, Jansson E, Kaijser L, Holmquist L, Carlson LA: Increased removal rate of exogenous triglycerides after prolonged exercise in man: time course and effect of exercise duration. *Metabolism* 36:438-443, 1987
134. Berr F, Engelhardt D, Paulus W, Rindfleisch GE, Witte J: [Leveen peritoneovenous shunt in refractory ascites]. *Internist (Berl)* 24:59-63, 1983
135. Redgrave TG, Carlson LA: Changes in plasma very low density and low density lipoprotein content, composition, and size after a fatty meal in normo- and hypertriglyceridemic man. *J Lipid Res* 20:217-229, 1979
136. Lopes-Virella MF, Klein RL, Virella G: Modification of lipoproteins in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 12:69-90, 1996
137. Karpe F, Hamsten A: Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J Lipid Res* 35:1311-1317, 1994
138. Rivellese AA, De NC, Di ML, Patti L, Iovine C, Coppola S, Del PS, Riccardi G, Annuzzi G: Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2153-2159, 2004

139. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH: Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40:1387-1395, 2004
140. Szczepaniak LS, Nuremberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL: Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E462-E468, 2005
141. Longo R, Pollesello P, Ricci C, Masutti F, Kvam BJ, Bercich L, Croce LS, Grigolato P, Paoletti S, de BB, .: Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 5:281-285, 1995
142. Longo R, Ricci C, Masutti F, Vidimari R, Croce LS, Bercich L, Tiribelli C, Dalla PL: Fatty infiltration of the liver. Quantification by ¹H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. *Invest Radiol* 28:297-302, 1993
143. Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, Yki-Jarvinen H: Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49:749-758, 2000
144. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214-E223, 1979
145. Rivellese AA, De NC, Di ML, Patti L, Iovine C, Coppola S, Del PS, Riccardi G, Annuzzi G: Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2153-2159, 2004
146. Annuzzi G, Giacco R, Patti L, Di ML, De NC, Costabile G, Marra M, Santangelo C, Masella R, Rivellese AA: Postprandial chylomicrons and adipose tissue lipoprotein lipase are altered in type 2 diabetes independently of obesity and whole-body insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:531-538, 2008
147. Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G: Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des* 16:1941-1951, 2010
148. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M: Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 48:634-642, 2005
149. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N: Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107:450-455, 1999
150. Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, Mari A, Diamant M: Lack of association of liver fat with model parameters of beta-cell function in men

- with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 159:251-257, 2008
151. Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, van Waesberghe JH, Schindhelm RK, Mari A, Heine RJ, Diamant M: Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30:2916-2921, 2007
 152. Rivellese A, Riccardi G, Giacco A, Pacioni D, Genovese S, Mattioli PL, Mancini M: Effect of dietary fibre on glucose control and serum lipoproteins in diabetic patients. *Lancet* 2:447-450, 1980
 153. Lairon D, Play B, Jourdhueil-Rahmani D: Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 18:217-227, 2007
 154. Burns N, Finucane FM, Hatunic M, Gilman M, Murphy M, Gasparro D, Mari A, Gastaldelli A, Nolan JJ: Early-onset type 2 diabetes in obese white subjects is characterised by a marked defect in beta cell insulin secretion, severe insulin resistance and a lack of response to aerobic exercise training. *Diabetologia* 50:1500-1508, 2007
 155. De NC, Annuzzi G, Bozzetto L, Mazzarella R, Costabile G, Ciano O, Riccardi G, Rivellese AA: Effects of a plant-based high-carbohydrate/high-fiber diet versus high-monounsaturated fat/low-carbohydrate diet on postprandial lipids in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 32:2168-2173, 2009
 156. Nutescu EA, Shapiro NL: Ezetimibe: a selective cholesterol absorption inhibitor. *Pharmacotherapy* 23:1463-1474, 2003
 157. Davidson MH, Toth PP: Combination therapy in the management of complex dyslipidemias. *Curr Opin Lipidol* 15:423-431, 2004
 158. Dubois C, Armand M, Ferezou J, Beaumier G, Portugal H, Pauli AM, Bernard PM, Becue T, Lafont H, Lairon D: Postprandial appearance of dietary deuterated cholesterol in the chylomicron fraction and whole plasma in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 64:47-52, 1996
 159. Beaumier-Gallon G, Dubois C, Senft M, Vergnes MF, Pauli AM, Portugal H, Lairon D: Dietary cholesterol is secreted in intestinally derived chylomicrons during several subsequent postprandial phases in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 73:870-877, 2001
 160. Parillo M, Riccardi G: Dietary carbohydrates and glucose metabolism in diabetic patients. *Diabete Metab* 21:391-401, 1995

APPENDICE

PUBBLICAZIONI IN EXTENSO

1. *Liver fat in obesity: role of type 2 diabetes mellitus and adipose tissue distribution.* **Bozzetto L**, Prinster A, Mancini M, Giacco R, De Natale C, Salvatore M, Riccardi G, Rivellese AA, Annuzzi G. Eur J Clin Invest. 2010 Sep 6.
2. *Effects of a plant based High carbohydrate-high fiber diet vs. High monounsaturated-low carbohydrate diet on postprandial lipids in type 2 diabetic patients.* De Natale C, Annuzzi G, **Bozzetto L**, Mazzearella R, Costabile G, Ciano O, Riccardi G, Rivellese AA. Diabetes Care. 2009 Sep
3. *An isoenergetic MUFA diet reduces liver fat in type 2 diabetes independently of aerobic training.* **Bozzetto L**, Annuzzi G, Prinster A, Costagliola L, Mangione A, Mazzearella R, Vitelli A, Salvatore M, Vigorito C, Riccardi G, Rivellese AA. Sottomesso per la pubblicazione su Diabetes Care
4. *Ezetimibe beneficially influences fasting and postprandial triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes* **Bozzetto L**, Annuzzi G, Corte GD, Patti L, Cipriano P, Mangione A, Riccardi G, Rivellese AA.. Atherosclerosis. 2011 Jul;217(1):142-8.
5. *Effects of meals with different glycemic index on postprandial blood glucose response in patients with type 1 diabetes treated with CSII* Parillo M, Annuzzi G, Rivellese AA, **Bozzetto L**, Alessandrini R, Riccardi G, Capaldo B. Diabet. Med. 28, 227–229 (2011)

Liver fat in obesity: role of type 2 diabetes mellitus and adipose tissue distribution

Lutgarda Bozzetto*, Anna Prinster^{†,‡}, Marcello Mancini[†], Rosalba Giacco[§], Claudia De Natale*, Marco Salvatore[¶], Gabriele Riccardi*, Angela A. Rivellese* and Giovanni Annuzzi*

*Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Naples, Italy, [†]Institute of Biostructure and Bioimage, National Research Council, Naples, Italy, [‡]SDN Foundation, Institute of Diagnostic and Nuclear Development, Naples, Italy, [§]Institute of Food Sciences, National Research Council, Avellino, Italy, [¶]Department of Biomorphological and Functional Science, Federico II University, Naples, Italy

ABSTRACT

Background Fatty liver is commonly associated with insulin-resistant conditions, often related to increased abdominal visceral fat. Our objective was to elucidate the specific roles of obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin-resistance and abdominal fat distribution.

Materials and methods The study population comprised 13 diabetic obese (DO), 10 nondiabetic obese (NDO), and nine normal-weight control (C) men aged 28–65 years, with normal plasma triglyceride levels. DO were in good glycaemic control (HbA1c = $6.8 \pm 0.8\%$) ($M \pm SD$) with diet ($n = 8$) or diet + metformin ($n = 5$). Liver fat content was measured by ¹H-magnetic resonance spectroscopy, abdominal fat distribution by magnetic resonance imaging and insulin sensitivity by hyperinsulinaemic euglycaemic clamp.

Results DO and NDO subjects had similar whole-body insulin resistance, BMI and waist circumference, higher than those of C subjects ($P < 0.001$). DO had more liver fat ($11.9 \pm 7.0\%$) than NDO ($5.2 \pm 2.8\%$, $P < 0.05$) and C ($1.6 \pm 1.0\%$, $P < 0.001$). Abdominal fat was greater in DO and NDO than in C (visceral: DO 3184 ± 843 , NDO 2843 ± 1378 vs. C 1212 ± 587 cm³, $P < 0.001$; subcutaneous: DO 4029 ± 362 , NDO 5197 ± 1398 vs. C 2312 ± 626 cm³, $P < 0.001$), visceral fat being not significantly different between the two obese groups, and subcutaneous fat significantly less in DO than in NDO ($P < 0.05$).

Conclusions Type 2 diabetes is associated with increased fat accumulation in the liver, independent of obesity and whole-body insulin resistance. The increased liver fat in DO patients may be part of an altered regional fat distribution that includes an inadequate subcutaneous fat storing capacity, rather than simply being a consequence of increased abdominal visceral content.

Keywords Fat distribution, insulin-resistance, liver fat, obesity, subcutaneous fat, type 2 diabetes.

Eur J Clin Invest 2010

Introduction

Obesity is strongly associated with liver fat accumulation. In an urban population of Northern Italy, the prevalence of liver steatosis was 76% in obese subjects [1], compared with 16% in the lean control group. Liver steatosis increases proportionally to the degree of obesity [2]. Body fat distribution, more than obesity *per se*, could play a relevant role in this association. In particular, abdominal visceral fat correlates with liver fat content in both nondiabetic (NDO) and diabetic obese (DO) individuals [3,4]. As it also strictly correlates with insulin resistance [5,6], abdominal visceral fat could be the link between increased adiposity and its associated metabolic abnormalities, including fatty liver.

Liver steatosis is also observed in association with hepatic and peripheral insulin resistance in both healthy lean individuals [7] and NDO subjects [8,9], showing that this association also occurs independent of obesity and type 2 diabetes.

In accordance with the close association between obesity, insulin-resistance and hepatic steatosis, a greater amount of liver fat is consistently found also in type 2 diabetes. Epidemiological data indicate that 34–74% of diabetic people have increased hepatic fat content, and almost all individuals with obesity and diabetes have hepatic steatosis [10]. However, current knowledge is still unable to explain the cause–effect relationship between liver fat accumulation and the associated

metabolic abnormalities. Moreover, the specific role of diabetes, independent of obesity, fat distribution and insulin-resistance, in the association with hepatic steatosis has not been well clarified. To this regard, two previous studies have found that obese patients with type 2 diabetes had a greater amount of liver fat content and abdominal visceral fat than equally obese nondiabetic patients [11,12]. In the first study, these results were obtained using computerized tomography, which provides less accurate data than the presently available measures for hepatic fat content (liver/fat ratio of attenuation value) and abdominal fat distribution (transversal section) [11]. In the second study, the effects of the differences in the clinical characteristics of the participants with and without diabetes were statistically corrected, leaving some uncertainties on the independent role of diabetes [12].

Recent data [13] indicate that individuals with type 2 diabetes have more visceral and intermuscular adipose tissue and less subcutaneous fat than nondiabetic control subjects, suggesting that the reduction of subcutaneous adipose tissue as well as the increase in abdominal visceral fat could contribute to the relationship between diabetes and hepatic steatosis. Unfortunately, in this study, liver fat content was not measured.

Therefore, the objective of our study was to explore the relation between type 2 diabetes and hepatic fat content, taking care of obesity and whole body insulin resistance. To this purpose, we assessed liver fat content by ^1H -magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) and insulin sensitivity by euglycaemic hyperinsulinaemic clamp in two groups of carefully matched obese patients, with and without type 2 diabetes, and in a control group of nondiabetic normal-weight individuals. We also determined abdominal fat distribution by magnetic resonance imaging (MRI) to investigate its link with liver fat accumulation.

Materials and methods

Subjects

Thirteen obese men with type 2 diabetes, treated with diet ($n = 8$) or diet and metformin ($n = 5$) in optimal blood glucose control (HbA1c: $6.8 \pm 0.8\%$, $M \pm \text{SD}$), 10 obese men without diabetes and 10 nondiabetic normal weight men who acted as controls participated in the study. Their main clinical characteristics are shown in Table 1. Obese subjects with and without diabetes were recruited at the outpatient clinic of the University Hospital. Diabetes was diagnosed according to the American Diabetes Association criteria and was excluded in the obese only subjects by an oral glucose tolerance test. Male patients with $\text{BMI} > 30 < 40 \text{ kg m}^{-2}$, normal fasting plasma concentrations of both triglycerides ($< 150 \text{ mg dL}^{-1}$) and cholesterol ($< 210 \text{ mg dL}^{-1}$), without any hypolipidaemic drug, were

Table 1 Main characteristics of the subjects participating in the study

	Diabetic obese	Obese	Controls
Men (n)	13	10	9
Age (years)	53 ± 9	47 ± 9	40 ± 2
BMI (kg m^{-2})	33.2 ± 2.3^a	34.2 ± 2.5^a	23.8 ± 1.2
Waist circumference (cm)	109 ± 7^a	111 ± 7^a	84 ± 5
Plasma cholesterol (mg dL^{-1})	177 ± 32	189 ± 39	156 ± 28
Plasma triglycerides (mg dL^{-1})	117 ± 98	98 ± 20	83 ± 37
HDL cholesterol (mg dL^{-1})	41 ± 8	39 ± 8	43 ± 7
AST (U L^{-1})	26 ± 13	27 ± 11	21 ± 7
ALT (U L^{-1})	37 ± 26^a	32 ± 9	20 ± 5
Plasma glucose (mg dL^{-1})	$131 \pm 22^{a,c}$	87 ± 13	79 ± 15
Plasma insulin ($\mu\text{U mL}^{-1}$)	14.9 ± 5.0^a	15.3 ± 7.3^a	6.9 ± 4.0
M/I ($\text{mg kg}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mU}^{-1} \text{ L}^{-1}$)	2.1 ± 0.2^b	1.9 ± 0.8^b	6.5 ± 2.9

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. Data are means \pm SD; $^aP < 0.05$ vs. controls; $^bP < 0.001$ vs. controls; $^cP < 0.05$ vs. obese.

consecutively enrolled in the study, upon acceptance. One control individual was excluded from the analyses because of his abnormally low insulin-sensitivity at the hyperinsulinaemic clamp. Moreover, he was an outlier in the control group also concerning liver fat content (9.16%) and abdominal fat distribution (subcutaneous/visceral ratio 0.63).

Participants had no history or symptoms of any known disease, apart from diabetes, nor were they vegetarians or engaged in intensive physical activity. The study protocol was approved by the Federico II University Ethics Committee and informed consent was given by the participants.

All participants underwent blood samples collection at fasting, and assessment of anthropometrics by standardized methodologies, liver fat content by ^1H -MRS, visceral and subcutaneous abdominal fat by MRI and whole-body insulin sensitivity by hyperinsulinaemic euglycaemic clamp.

Liver fat content

Proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) was performed on a 1.5T MR scanner (Intera; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) equipped for proton spectroscopy acquisitions. Sagittal, coronal and axial slices covering the whole liver were preliminarily taken to position the spectroscopy acquisition voxel. A single voxel of 8 cc ($2 \times 2 \times 2 \text{ cm}$) was placed within the right lobe avoiding major vascular struc-

tures and subcutaneous fat tissue. The proton spectrum was acquired using the body coil after shimming over the volume of interest using a PRESS sequence with the following parameters: TR = 3000 ms, TE = 40 ms, 1024 data points over 1000 KHz spectral width, 16 acquisitions. Signal intensities of the water peak at 4.8 ppm (S_w) and the methylene groups – which represent intracellular triglyceride in the liver at 1.4 ppm (S_f) – were calculated as the integral of the two peaks after correcting the signal for phase shifting and baseline drift, by time domain fitting routine (AMARES-MRUI, <http://www.mrui.uab.es/mrui/>). Signal decay was corrected for the different T_2 decay of water and fat using mean T_2 relaxation times of 50 and 60 ms for water and fat, respectively. Hepatic fat percentage was calculated using the formula: $100 \times S_f / (S_f + S_w)$ [14]. These values represent a relative quantity of water and fat in the volume of interest. To convert these values into absolute concentrations (w/v) expressed as percent fat, equations validated by Longo *et al.* [14,15] were applied.

Visceral and subcutaneous abdominal fat

Visceral and subcutaneous fat were determined by a series of T1-weighted axial images acquired with MRI techniques, on a region extending from 8 cm above to 8 cm below the fourth lumbar interspace using a Gradient-Echo sequence (16 slices, slice thickness 10 mm, TR/TE = 130 ms/4.6 ms, Flip-angle 80°, breath-hold acquisition). Visceral and subcutaneous abdominal fat volumes were measured using an in-house image analysis software developed using Interactive Data Language (IDL, Research, Inc., Boulder, CO, USA). The software calculates a histogram of pixel intensity of the original images, and the intensity corresponding to the nadir between the lean and fat peaks is used as a threshold to define adipose tissue pixels (i.e. the pixels above the threshold value) [16].

Subsequently, subcutaneous fat is calculated as the sum of adipose tissue voxels falling within the subcutaneous region, selected on the original images using the region's growing semi-automated procedure implemented in a commercial photo-editing software (Photoshop; Adobe, Mountain View, CA, USA), whereas the remaining adipose voxels are assigned to the intra-abdominal fat.

Hyperinsulinaemic euglycaemic clamp [17]

Regular human insulin was administered intravenously at a constant rate of 1.5 mU kg^{-1} body weight per min for 2 h. At the same time, a variable amount of a 33% glucose solution was also infused to maintain blood glucose concentration around 5.0 mM. The glucose infusion rate (mg kg^{-1} body weight per min) during the last 30 min divided by the concomitant plasma insulin concentrations (mU L^{-1}), multiplied by 100 was calculated as a measure of insulin sensitivity (M/I value).

Other measurements

Total cholesterol, triglyceride and glucose concentrations were assayed in plasma by enzymatic colorimetric methods (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) on an auto-analyser Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, France). Plasma insulin concentrations were measured by radioimmunoassay (Technogenetics, Milan, Italy). Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were determined by colorimetric methods according to the International Federation of Clinical Chemistry recommendations.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), unless otherwise stated. The differences between the three groups were analysed by ANOVA and the *post hoc* test (LSD). Variables not normally distributed were analysed after logarithmic transformation or by nonparametric tests (Wilcoxon signed ranks test). Analysis was performed according to standard methods using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL, USA). A P value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

DO and NDO participants were comparable for body mass index and waist circumference (Table 1). Compared with controls, they had a similar reduction in insulin sensitivity, as shown by the lower M/I ratio during the insulin clamp. Accordingly, they also had significantly higher fasting plasma insulin levels than controls (Table 1).

ALT plasma concentrations were significantly higher in DO subjects than in controls ($P = 0.04$), whereas the difference with NDO subjects was not significant ($P = 0.53$) (Table 1). All participants had fasting plasma triglycerides and cholesterol concentrations within desirable levels (Table 1).

Liver fat content

Liver fat content, measured by ^1H -MRS, was significantly higher in DO ($11.9 \pm 7.0\%$) than in NDO individuals ($5.2 \pm 2.8\%$, $P < 0.05$) or controls (1.6 ± 1.0 , $P < 0.001$) (Fig. 1). Considering the 95% cut-off observed in a population-based study in individuals without known liver disease and metabolic alterations [14], 11 of the 13 DO subjects (85%), and five of the 10 obese subjects (50%) had hepatic fat content above normal values (5%), whereas all control subjects had normal fat content. As shown in Fig. 1, the DO subjects seem to fall into two subgroups, which did not differ with respect to any metabolic parameter or therapy with metformin.

Abdominal fat distribution

As expected, total abdominal fat was significantly higher in both obese subjects with diabetes ($7215 \pm 1809 \text{ cm}^3$) and

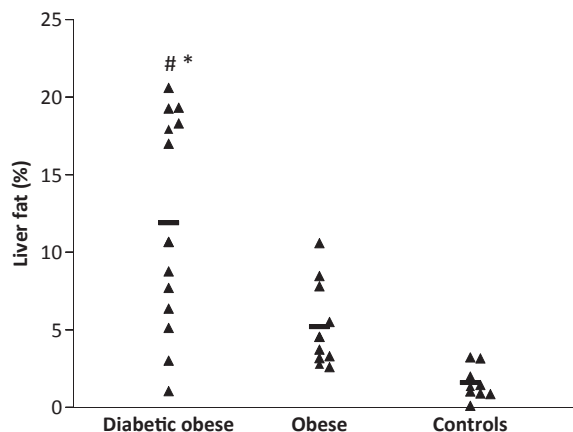


Figure 1 Liver fat content in diabetic obese, nondiabetic obese and control subjects. —, mean value; * $P < 0.001$ vs. controls; # $P < 0.05$ vs. obese.

without diabetes ($8041 \pm 1933 \text{ cm}^3$) compared with controls ($3457 \pm 729 \text{ cm}^3$, $P < 0.0001$). However, although visceral adipose tissue was only slightly more abundant in DO than in NDO patients (3184 ± 843 vs. 2844 ± 1378 , $P = 0.438$), subcutaneous adipose tissue (4029 ± 1362 vs. 5198 ± 1398 , $P < 0.05$) and subcutaneous/visceral ratio (1.30 ± 0.39 vs. 2.11 ± 0.96 , $P < 0.05$) were significantly lower in DO than in NDO subjects (Fig. 2).

Discussion

In this study, DO patients had a significantly greater hepatic fat content than both lean controls and nondiabetic, similarly obese, individuals. As the obese subjects with and without diabetes were all normotriglyceridemic men, with strictly comparable degrees of adiposity and whole-body insulin sensitivity, our results are the first to show, without any correction for confounding factors, that obese patients with type 2 diabetes have increased fat accumulation in the liver, also in the absence of other major metabolic abnormalities. These results are consistent with the findings by Kelley *et al.* [11], which semi-quantitatively determined liver fat content by computerized tomography in 83 men and women with type 2 diabetes and in two smaller groups of NDO and lean control subjects. Similar results were also obtained by Kotronen *et al.* [12] in DO and NDO individuals of both genders, which differed for lipids and insulin fasting plasma concentrations. Moreover, some of the diabetic and nondiabetic patients were receiving statins or anti-hypertensive medications and some of the obese diabetic patients were on insulin treatment.

Different mechanisms may explain the increased liver fat observed in the type 2 diabetic participants of our study. As

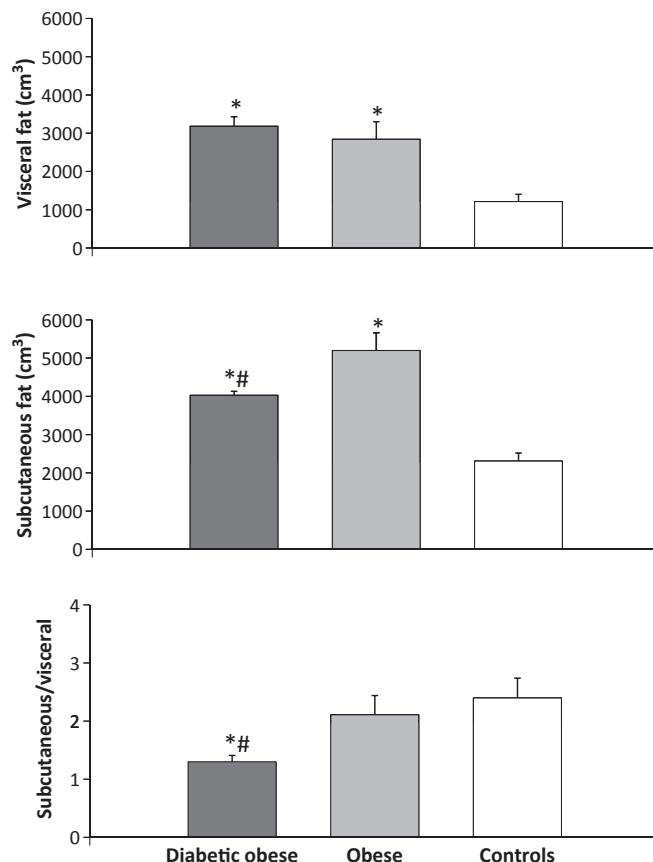


Figure 2 Visceral and subcutaneous abdominal fat content, and visceral/subcutaneous ratio in diabetic obese, nondiabetic obese and control subjects. Data are $M \pm \text{SEM}$; * $P < 0.001$ vs. controls; # $P < 0.05$ vs. obese.

diabetes was associated with hepatic fat accumulation independent of whole-body insulin resistance and obesity, other factors specifically related to diabetes should be considered.

Hyperglycaemia is obviously the most specific of these factors. To our knowledge, there are no data in humans regarding the effects of hyperglycaemia *per se* on liver fat accumulation. It has been shown in *in vitro* studies that high blood glucose induces mitochondrial dysfunction in hepatocytes [18] and in human hepatic biopsies that hepatic steatosis is associated with abnormalities of mitochondria morphology and activity [19]. It is therefore possible that hyperglycaemia could induce fat accumulation in the liver through the alteration of mitochondrial function [20], leading in turn to reduced fatty acid oxidation. On the other hand, hyperglycaemia may be a consequence of liver fat accumulation, which could affect either insulin action and/or beta cell function. Although the obese patients with and without diabetes in our study had a similar degree of whole-

body insulin resistance, we had no measures of hepatic insulin sensitivity. As hepatic insulin sensitivity is inversely correlated with liver fat content in healthy lean people with nonalcoholic fatty liver disease [4,7,21], in obese nondiabetic people [8,9,22] and in lean and obese type 2 diabetic patients [11,12,23], it is possible that our DO subjects had a higher hepatic insulin resistance than the obese nondiabetic ones. Liver fat accumulation could also influence insulin secretion, as suggested by its positive correlations with fasting C peptide levels in individuals with either metabolic syndrome or diabetes [12,23], inducing a long-term functional stress through the associated peripheral and hepatic insulin resistance culminating in beta cell failure. However, a study investigating the contribution of liver fat to abnormalities in dynamic aspects of beta cell function pointed out to the lack of relationship between liver fat content and dynamic beta cell function in individuals with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes [24], suggesting that factors other than liver fat act in the determination of beta cell failure of diabetic patients. To this regard, a recent study has demonstrated that accumulation of fat in the pancreas determines beta cell dysfunction in diabetic and nondiabetic patients [25].

The second relevant finding of our study is that abdominal subcutaneous fat was significantly lesser in DO than in NDO subjects, with no significant differences in amount of visceral adipose tissue. These results are somewhat consistent with those recently reported in the Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) Trial [13], which showed that whole body subcutaneous adipose tissue was lesser in overweight-obese type 2 diabetic patients than in overweight-obese nondiabetic subjects after correction, in a fitted model, for race, age, gender, presence of diabetes and other variables. However, abdominal subcutaneous fat was not different between the two groups, whereas upper leg subcutaneous fat was significantly less in type 2 diabetes than in control subjects.

In our study, abdominal subcutaneous fat seemed a protective factor against liver fat accumulation and development of type 2 diabetes in this selected group of obese individuals who were neither dyslipidemic nor hypertensive, i.e. had no other sign of metabolic abnormalities. Larger amounts of subcutaneous adipose tissue may protect from the deposition of fat in ectopic sites such as liver and beta cells, limiting the deleterious effects of visceral fat depots. In support of this hypothesis, the size of subcutaneous abdominal adipocyte predicted the onset of type 2 diabetes over a follow-up of 9 years in Pima Indians with normal glucose tolerance [26]. In fact, individuals who developed diabetes had larger subcutaneous abdominal adipocytes at baseline and experienced no further increase in body weight during the follow-up period, suggesting that they had no residual storing capacity in adipose tissue and therefore accumulated fat in other tissues/organs. Accordingly, the expression in subcuta-

neous adipose tissue of some genes involved in adipogenesis was blunted in obese subjects with type 2 diabetes compared with obese subjects without diabetes [27]. Moreover, in an interesting animal model, transgenic ob/ob mice that expanded subcutaneous fat through chronic elevation of adiponectin showed the regression of adverse metabolic conditions and ectopic fat deposition [28].

Some strengths and limitations of this study should be considered. Strengths are that for the first time, we demonstrated a higher liver fat content and a lesser content of subcutaneous abdominal fat in individuals with type 2 diabetes, in the absence of confounding factors, i.e. comparing them with nondiabetic subjects similar for other anthropometric, metabolic and clinical characteristics, and therefore without the need for statistical corrections that were necessary in previous studies.

Furthermore, we utilized the current golden standard methods for the measurement of liver fat content (¹H-MRS), abdominal fat distribution (MRI), and insulin sensitivity (hyperinsulinaemic euglycaemic clamp).

Limitations of this study are (i) the small sample size, which was in any case sufficient to appreciate the differences between the groups, (ii) only men were studied and therefore our results are not applicable to women and (iii) we had no measures of hepatic insulin resistance.

In conclusion, type 2 diabetes is associated with an increased fat accumulation in the liver, independent of obesity and whole-body insulin resistance. This higher liver fat content is likely the expression of a more generalized alteration of fat distribution, which could lead to the development of diabetes because it involves key sites of glucose metabolism such as the muscle, the liver itself and the beta cells.

Disclosure

The authors have nothing to disclose.

Authors' contribution

Writing of manuscripts (LB, GA, AP), design of experiment (LB, GA, AP, AAR, GR), collection and analysis of data (LB, CDN, RG), imaging studies (AP, MM, MS).

Address

Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Naples, Italy (L. Bozzetto, C. De Natale, G. Riccardi, A. A. Rivellese, G. Annuzzi); Institute of Biostructure and Bioimage, National Research Council, Naples, Italy (A. Prinster, M. Mancini); SDN Foundation, Institute of Diagnostic and Nuclear Development, Naples, Italy (A. Prinster); Institute of Food Sciences, National Research Council, Avellino, Italy (R. Giacco); Department of Biomorphological and Functional Science, Federico II University, Naples, Italy (M. Salvatore).

Correspondence to: Giovanni Annuzzi, Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University Medical School, Via S Pansini 5, 80131 Naples, Italy.

Tel.: +390817462311; fax: +390817462311;

e-mail: annuzzi@unina.it

Received 9 April 2010; accepted 4 August 2010

References

- 1 Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F *et al.* Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000;**132**:112–7.
- 2 Luyckx FH, Desai C, Thiry A, Dewe W, Scheen AJ, Gielen JE *et al.* Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastropasty. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;**22**:222–6.
- 3 Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R *et al.* Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007;**133**:496–506.
- 4 Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 2005;**42**:987–1000.
- 5 Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR *et al.* The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations: distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes* 2002;**51**:1005–15.
- 6 Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I. Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;**282**:E657–63.
- 7 Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ *et al.* Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;**107**:450–5.
- 8 Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A *et al.* Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:3023–8.
- 9 Venturi C, Zoppini G, Zamboni C, Muggeo M. Insulin sensitivity and hepatic steatosis in obese subjects with normal glucose tolerance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004;**14**:200–4.
- 10 Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ *et al.* Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990;**85**:1349–55.
- 11 Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RA, Kuller LH, Kalhan SC. Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;**285**:E906–16.
- 12 Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R *et al.* Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;**31**:165–9.
- 13 Gallagher D, Kelley DE, Yim JE, Spence N, Albu J, Boxt L *et al.* Adipose tissue distribution is different in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2009;**89**:807–14.
- 14 Longo R, Pollesello P, Ricci C, Masutti F, Kvam BJ, Bercich L *et al.* Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 1995;**5**:281–5.
- 15 Longo R, Ricci C, Masutti F, Vidimari R, Croce LS, Bercich L *et al.* Fatty infiltration of the liver. Quantification by ¹H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. *Invest Radiol* 1993;**28**:297–302.
- 16 Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J *et al.* Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;**49**:749–58.
- 17 DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;**237**:E214–23.
- 18 Palmeira CM, Rolo AP, Berthiaume J, Bjork JA, Wallace KB. Hyperglycemia decreases mitochondrial function: the regulatory role of mitochondrial biogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;**225**:214–20.
- 19 Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespdenheide EE, Parks JK *et al.* Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;**31**:430–4.
- 20 Demeilliers C, Maisonneuve C, Grodet A, Mansouri A, Nguyen R, Tinel M *et al.* Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology* 2002;**123**:1278–90.
- 21 Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S *et al.* Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005;**48**:634–42.
- 22 Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology* 2008;**134**:1369–75.
- 23 Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietilainen KH, Yki-Jarvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:3490–7.
- 24 Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, Mari A, Diamant M. Lack of association of liver fat with model parameters of beta-cell function in men with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2008;**159**:251–7.
- 25 Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, van Waesberghe JH, Schindhelm RK *et al.* Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007;**30**:2916–21.
- 26 Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 2000;**43**:1498–506.
- 27 Dubois SG, Heilbronn LK, Smith SR, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E. Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2006;**14**:1543–52.
- 28 Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM *et al.* Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007;**117**:2621–37.

Effects of a Plant-Based High-Carbohydrate/High-Fiber Diet Versus High-Monounsaturated Fat/Low-Carbohydrate Diet on Postprandial Lipids in Type 2 Diabetic Patients

CLAUDIA DE NATALE, MD, PHD
GIOVANNI ANNUZZI, MD
LUTGARDA BOZZETTO, MD
RAFFAELLA MAZZARELLA, MD

GIUSEPPINA COSTABILE, PHD
ORNELLA CIANO, RD
GABRIELE RICCARDI, MD
ANGELA A. RIVELLESE, MD

OBJECTIVE — To search for a better dietary approach to treat postprandial lipid abnormalities and improve glucose control in type 2 diabetic patients.

RESEARCH DESIGN AND METHODS — According to a randomized crossover design, 18 type 2 diabetic patients (aged 59 ± 5 years; BMI 27 ± 3 kg/m²) (means \pm SD) in satisfactory blood glucose control on diet or diet plus metformin followed a diet relatively rich in carbohydrates (52% total energy), rich in fiber (28g/1,000 kcal), and with a low glycemic index (58%) (high-carbohydrate/high-fiber diet) or a diet relatively low in carbohydrate (45%) and rich in monounsaturated fat (23%) (low-carbohydrate/high-monounsaturated fat diet) for 4 weeks. Thereafter, they shifted to the other diet for 4 more weeks. At the end of each period, plasma glucose, insulin, lipids, and lipoprotein fractions (separated by discontinuous density gradient ultracentrifugation) were determined on blood samples taken at fasting and over 6 h after a test meal having a similar composition as the corresponding diet.

RESULTS — In addition to a significant decrease in postprandial plasma glucose, insulin responses, and glycemic variability, the high-carbohydrate/high-fiber diet also significantly improved the primary end point, since it reduced the postprandial incremental areas under the curve (IAUCs) of triglyceride-rich lipoproteins, in particular, chylomicrons (cholesterol IAUC: 0.05 ± 0.01 vs. 0.08 ± 0.02 mmol/l per 6 h; triglycerides IAUC: 0.71 ± 0.35 vs. 1.03 ± 0.58 mmol/l per 6 h, $P < 0.05$).

CONCLUSIONS — A diet rich in carbohydrate and fiber, essentially based on legumes, vegetables, fruits, and whole cereals, may be particularly useful for treating diabetic patients because of its multiple effects on different cardiovascular risk factors, including postprandial lipids abnormalities.

Diabetes Care 32:2168–2173, 2009

The clinical and scientific relevance of postprandial lipid abnormalities is based on the evidence of their association with a higher cardiovascular risk as recently shown by the results of two large prospective studies (1,2). Patients with type 2 diabetes have more pronounced postprandial dyslipidemia (3,4),

and this may account, at least in part, for their higher rate of cardiovascular diseases, not explained by hyperglycemia and the classic cardiovascular risk factors alone (5).

Despite the clinical relevance of postprandial lipid alterations, there is little scientific evidence on the potential thera-

peutic interventions able to correct these abnormalities. If we consider that humans spend most of their time in the postprandial condition and that all the lipid alterations in this state greatly outnumber those occurring in fasting conditions, diet is the natural approach to correct postprandial abnormalities. However, while it has been repeatedly demonstrated that dietary treatment in type 2 diabetic patients is able to improve glucose control and blood lipids at fasting (6), there are few data on the effects of various diets on postprandial lipemia (7). The Mediterranean diet is generally recommended as a useful nutritional tool for the prevention of cardiovascular disease because it is able to act positively on the main cardiovascular risk factors, including excess body weight (8). However, the two main components of the Mediterranean diet—olive oil rich in monounsaturated fat and foods rich in carbohydrate and fiber—traditionally found in association in the Mediterranean diet of some decades ago are now often considered in opposition. In particular, a diet rich in carbohydrate is considered less effective on fasting lipid metabolism than one rich in monounsaturated fat (MUFA), as it induces higher plasma triglycerides concentrations (22%) and lower HDL cholesterol levels (4%) (9); these untoward effects, however, can be avoided by selecting carbohydrate rich foods with high fiber content and a low glycemic index (10).

It can be hypothesized that a diet containing these kinds of foods may be more beneficial on postprandial lipid metabolism compared with a MUFA-rich diet, which, given the higher fat content, could induce a postprandial increase in triglyceride-rich lipoproteins, especially of exogenous origin.

On the basis of this working hypothesis, the aim of this intervention study was to evaluate in type 2 diabetic patients the effects on postprandial lipemia and glucose metabolism (both in everyday life

From the Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Naples, Italy.

Corresponding author: Angela A. Rivellese, rivelles@unina.it.

Received 11 February 2009 and accepted 1 September 2009. Published ahead of print at <http://care.diabetesjournals.org> on 9 September 2009. DOI: 10.2337/dc09-0266. Clinical trial reg. no. NCT00789295, clinicaltrials.gov.

© 2009 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

conditions and after a standard test meal) of two diets—one moderately rich in carbohydrate, rich in fiber, and with a low glycemic index and the other relatively low in carbohydrate and rich in MUFA.

Because adipose tissue, mainly through its lipolytic activities, is considered as having a pivotal role in the buffering of lipid flux in the postprandial period (11), a further goal of our study was to evaluate the activities of lipoprotein lipase (LPL) and hormone-sensitive lipase (HSL) after consumption of the two diets as possible mechanisms of different effects on postprandial lipid metabolism.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

A total of 19 type 2 diabetic patients were enrolled in the study, after giving their written informed consent. There was one dropout because of concomitant family problems; therefore, 12 men and 6 women, aged 59 ± 5 years (means \pm SD), concluded the study. Patients were slightly overweight (BMI 27 ± 3 kg/m²), in satisfactory blood glucose control (A1C $6.9 \pm 0.7\%$) on diet alone ($n = 13$) or diet plus metformin ($n = 5$), and with normal fasting plasma lipid levels. They were all sedentary and did not change their physical activity level throughout the study. The protocol was approved by the Federico II University Ethics Committee.

Sample size

Based on differences in the postprandial responses of triglycerides in the chylomicrons and VLDL fractions between diabetic and control subjects (0.7 mmol/l per 6 h, SD 0.85 mmol/l) (12), we considered as clinically relevant a 30% difference between the two treatments of the primary end point (postprandial incremental area of triglycerides content in chylomicrons and VLDL fraction). To detect this difference with an 80% power at a P value of 5% (two-tailed), 13 patients had to be studied.

Study design

The study was performed according to a randomized crossover design. After a run-in period of 4 weeks, during which patients were stabilized on their own diet, they followed, in alternate order, two isoenergetic diets, each for 4 weeks. One diet was relatively rich in carbohydrate, rich in dietary fiber both of soluble and insoluble type, and with a low glycemic index; the other was rich in MUFA, relatively low in carbohydrate, low in dietary

Table 1—Composition of the two isoenergetic diets recommended and followed by the patients

	High-carbohydrate/high-fiber diet		Low-carbohydrate/high-MUFA diet	
	Recommended	Followed	Recommended	Followed
Total energy (kcal/day)	1,918	1,874 \pm 315	1,939	1,862 \pm 348
Proteins (%)	18	18 \pm 1	18	18 \pm 1
Total fat (%)	30	30 \pm 1*	37	37 \pm 1
Saturated fat (%)	7	7 \pm 1	7	7 \pm 1
MUFA (%)	17	17 \pm 1*	23	23 \pm 1
Polyunsaturated n-6 fat (%)	3.9	4.2 \pm 0.3	4.2	4.3 \pm 0.3
Cholesterol (g/day)	143	133 \pm 43	158	160 \pm 32
Carbohydrates (%)	52	51 \pm 1*	45	44 \pm 1
Starch (%)	41	39 \pm 1*	35	34 \pm 1
Soluble (%)	10.5	12 \pm 1	10.1	10 \pm 1
Fiber (g/1,000 kcal)	28	27 \pm 2*	8	8 \pm 1
Glycemic index (%)	58	60 \pm 4*	88	87 \pm 2
Glycemic load	155	154 \pm 24*	205	207 \pm 37

Data are means \pm SD. * $P < 0.05$ vs. low-carbohydrate/high-MUFA diet.

fiber, and with a relatively high glycemic index (Table 1). The glycemic load of the high-carbohydrate/high-fiber diet was lower than that of the high-MUFA diet (155 vs. 205). The other components of the two diets, in particular, the saturated fat content, were similar (Table 1). Calories and nutrients of the diets were calculated from tables of food composition of the Italian Institute of Nutrition using the MetaDieta software (Meteda s.r.l., Ascoli-Piceno, Italy). The main components of the two diets were as follows: 1) a portion of legumes four times a week, one serving of pasta twice a week, and one serving of par-boiled rice once a week; two servings of vegetables and two fruits per day; and whole-grain bread for the high-carbohydrate/high-fiber diet and 2) white bread, a serving of potatoes, rice, or pasta each twice weekly; a serving of pizza once a week; and use of vegetables and fruits low in fiber for the low-carbohydrate diet (a weekly meal schedule for both dietary treatments is shown in an online appendix, Tables S1 and S2, available at <http://care.diabetesjournals.org/cgi/content/full/dc09-0266/DC1>).

To improve dietary compliance, patients were seen weekly by an experienced dietitian who, in addition, called them every 2–3 days to ensure that they followed the diet assigned. Adherence to the two dietary treatments was evaluated by a 3-day food record filled in by the patients at the end of the two periods.

Experimental procedures

At the end of each dietary intervention period, patients underwent the following procedures: 1) 12-h fasting blood sam-

pling for the determination of total, LDL, and HDL cholesterol and triglycerides; 2) home self-measurement of triglyceride and glucose levels with samples taken at fasting, immediately before, and 2 and 3 h after lunch and before dinner for 2 days at the end of each dietary treatment; and 3) a test meal with a composition similar to the dietary treatment being followed, with blood samples taken at fasting (at least 12 h) and 2, 4, and 6 h after the meal to evaluate glucose, insulin, cholesterol, and triglycerides in plasma and lipoprotein subfractions. The test meal was performed in 12 patients. The composition of the test meal performed at the end of the high-fiber diet was 52% carbohydrate (41% starch, 11% soluble), 30% fat (7% saturated), and 18% protein and consisted of beans and pasta soup plus an apple. The composition of the test meal performed at the end of the low-carbohydrate/high-MUFA diet was 45% carbohydrate (34% starch, 11% soluble), 37% fat (7% saturated), and 18% protein and consisted of a potato gateau (a pie made of mashed potato, whole milk, eggs, cheese, ham, and butter) plus orange juice. The energy content of the two test meals was 948 kcal. 4) Six hours after the test meal, a needle biopsy of abdominal subcutaneous adipose tissue was taken for the determination of LPL and HSL activities.

Laboratory procedures

All laboratory measurements were made blind to the dietary treatments.

Lipoprotein separation. Samples were kept at 4°C before, during, and after centrifugation. Fasting and postprandial li-

poprotein subfractions were isolated by discontinuous density gradient ultracentrifugation, as previously described (5). Briefly, three consecutive runs were performed at 15°C and at 40,000 rpm to float chylomicrons (Svedberg flotation unit [Sf] >400), large VLDL (Sf 60–400), and small VLDL (Sf 20–60). Intermediate-density lipoproteins (Sf 12–20) and LDLs (Sf 0–12) were recovered from the gradient after the Sf 20–60 particles had been collected. HDLs were isolated by a precipitation method.

Adipose tissue lipases activities.

Heparin-releasable LPL, total LPL, and HSL activities were determined as previously described (13).

Other measurements. Cholesterol and triglyceride concentrations were assayed by enzymatic colorimetric methods; plasma insulin concentrations were acquired by enzyme-linked immunosorbent assay.

Home self-measurements of triglyceride levels were performed by a GCT Accutrend instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), a method already validated (3).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD unless otherwise stated. Postprandial incremental areas were calculated by the trapezoidal method as the area under the curve above the baseline value (IAUC). Coefficients of variations of plasma glucose at different points after test meals were evaluated as an index of postprandial glycemic variability (14). Differences between the two diets were evaluated by ANOVA for repeated measures and *t* test for paired data. Two-tailed tests were used, and a $P < 0.05$ was considered statistically significant. Variables not normally distributed were analyzed after logarithmic transformation or by nonparametric tests.

Because there was no carry-over effect, the results of patients starting with either diet were put together. The statistical analysis was performed according to standard methods using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL).

RESULTS — There were no changes in body weight during the experiment (73.0 kg after both dietary treatments). The compliance to the two diets was optimal, as shown by the average composition of the diet followed by subjects (Table 1). As expected, the two diets followed by patients were significantly different for total

fat, MUFA, carbohydrate, fiber, glycemic index, and glycemic load (Table 1). Both diets were well accepted by patients.

Fasting plasma lipoproteins

At the end of the high-carbohydrate/high-fiber diet, there was a significant reduction of total cholesterol (4.20 ± 0.70 vs. 4.40 ± 0.78 mmol/l, $P < 0.05$), LDL cholesterol (2.62 ± 0.60 vs. 2.82 ± 0.62 mmol/l, $P < 0.05$), and HDL cholesterol (0.98 ± 0.25 vs. 1.06 ± 0.26 mmol/l, $P < 0.05$) and an increase in HDL triglycerides (0.20 ± 0.05 vs. 0.18 ± 0.05 mmol/l, $P < 0.05$) in comparison with the low-carbohydrate/high-MUFA diet, whereas triglyceride levels in plasma (1.16 ± 0.38 vs. 1.07 ± 0.39 mmol/l) and LDL (0.41 ± 0.11 vs. 0.41 ± 0.09 mmol/l) were similar.

Home self-monitoring

Blood glucose levels measured by patients (average of two daily profiles) were significantly lower during the high-carbohydrate/high-fiber diet both 2 h (7.2 ± 1.1 vs. 9.2 ± 2.9 mmol/l; $P < 0.05$) and 3 h (5.9 ± 1.3 vs. 7.3 ± 1.5 mmol/l; $P < 0.05$) after lunch. Similarly, self-monitored triglyceride levels (average of two daily profiles) were 30% lower 3 h after lunch.

Plasma glucose and insulin responses to test meals

After the high-carbohydrate/high-fiber test meal, performed at the end of the corresponding diet, plasma glucose concentrations were lower in the first part of the postprandial curve, especially after 2 h ($P = 0.06$) (Fig. 1A). The same pattern was observed for plasma insulin, significantly lower at the second and third hour ($P < 0.05$ for both) than after the low-carbohydrate/high-MUFA test meal performed at the end of the corresponding diet (Fig. 1D). ANOVA for repeated measures was statistically significant for plasma glucose ($P < 0.05$) and plasma insulin curves ($P < 0.008$). The combination of the effects on plasma glucose and insulin led to a reduction of the insulin-to-glucose ratio both at the second (0.44 ± 0.30 vs. 0.52 ± 0.46) and third hour (0.39 ± 0.29 vs. 0.49 ± 0.34 ; $P < 0.05$) after the high-carbohydrate/high-fiber test meal. On the contrary, plasma glucose and insulin levels were both significantly higher 6 h after the high-carbohydrate/high-fiber meal than after the other test meal ($P < 0.05$) (Fig. 1A and D). These patterns in the postpran-

dial curve corresponded to 1) a nearly 50% decrease in plasma glucose IAUC until the third hour ($P < 0.05$) (Fig. 1B); 2) a significant reduction in insulin IAUC by 14 and 21%, at 3 and 6 h, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 1E); and 3) a significant decrease of nearly 50% in postprandial glycemic variability ($P < 0.02$) (Fig. 1C).

Plasma lipid and lipoprotein responses to test meals

At the end of the high-carbohydrate/high-fiber diet, postprandial IAUC of plasma triglycerides decreased by 31% compared with the low-carbohydrate/high-MUFA diet (1.87 ± 1.22 vs. 2.70 ± 1.58 mmol/l per 6 h), whereas no significant differences were observed for plasma cholesterol IAUC. In terms of peak postprandial changes, the 4-h increments were 0.4 ± 0.3 mmol/l for the high-carbohydrate/high-fiber diet and 0.6 ± 0.4 mmol/l for the other diet ($P < 0.05$).

The postprandial responses of triglyceride-rich lipoproteins are reported in Fig. 2. Both triglycerides and cholesterol in chylomicrons were lower after the test meal performed at the end of the high-carbohydrate/high-fiber diet, and the IAUC was significantly reduced by 31 and 46%, respectively ($P < 0.05$ for both) (Fig. 2A and B). Similarly reduced was the triglyceride content of large VLDL (IAUC 1.46 ± 0.94 vs. 1.97 ± 1.22 mmol/l per 6 h, $P < 0.06$) (Fig. 2D), small VLDL (IAUC -0.21 ± 0.24 vs. -0.15 ± 0.21 mmol/l per 6 h, $P = 0.07$), and LDL (IAUC -0.05 ± 0.06 vs. 0.17 ± 0.05 mmol/l per 6 h, $P < 0.05$). No differences were observed in the postprandial response of the other lipoproteins (data not shown).

Lipases activities

Both total and heparin-releasable LPL activities in adipose tissue were not significantly different at the end of the two diets (total LPL activity: $2,792 \pm 958$ vs. $3,375 \pm 2,251$ nmol fatty acid per gram per hour; heparin releasable LPL activity: 146 ± 70 vs. 184 ± 117 nmol fatty acid per gram per hour). Likewise, no difference was observed in HSL activity (616 ± 237 vs. 676 ± 210 nmol fatty acid per gram per hour).

CONCLUSIONS — This study clearly shows, for the first time, that a diet moderately rich in carbohydrate, rich in dietary fiber, and, consequently, with low glycemic index and glycemic load, essentially based on consumption of legumes,

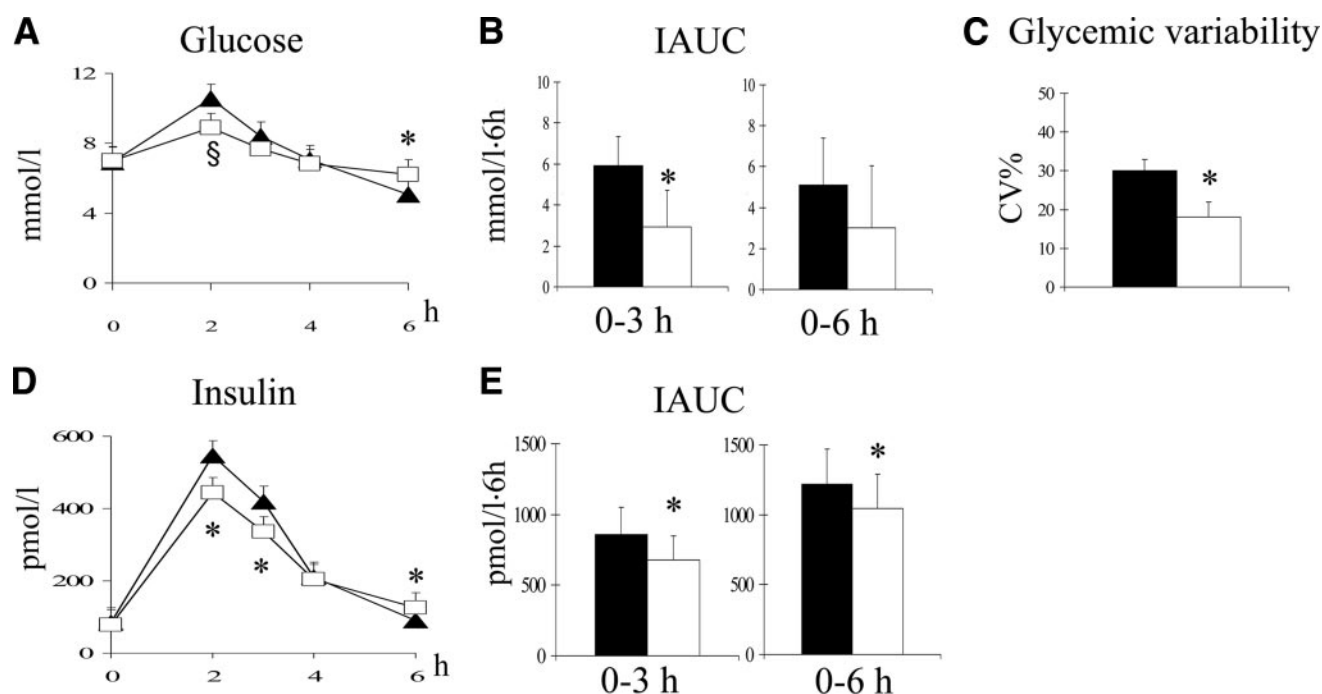


Figure 1—Plasma glucose and insulin curves (A and D), plasma glucose and IAUC (B and E), and glycemic variability (C) after a high-carbohydrate/high-fiber test meal (white squares and white bars) or a low-carbohydrate/high-MUFA test meal (▲, ■) performed at the end of the corresponding diet (means \pm SE, significance for paired *t* test: **P* < 0.05, §*P* = 0.06; significance for repeated measures ANOVA: *P* < 0.05 for plasma glucose and *P* < 0.008 for plasma insulin).

vegetables, fruits, and whole cereals, induces a significant reduction of postprandial lipoproteins, particularly chylomicrons, in type 2 diabetic patients. This effect was observed in experimental conditions, i.e., after a standard test meal, but also in everyday life, where there was a 30% reduction of plasma triglycerides 3 h after lunch, despite the well-known high day-to-day triglyceride variability (20% in our data).

Moreover, our results confirm that this kind of diet is to be preferred to a diet low in carbohydrate and rich in MUFA for its effects on:

1) Postprandial blood glucose control, with lower peaks in the first part of the postprandial period. This blunted postprandial profile implies a reduced variability of blood glucose levels (almost halved in our study), considered so important in the prevention of cardiovascular disease in diabetic patients (15), as well as a lower risk of late postprandial hypoglycemia (16).

2) Postprandial insulin levels, which are significantly reduced concomitantly with the presence of lower blood glucose levels, suggesting an improvement in insulin action.

3) LDL cholesterol levels, significantly reduced also in normocholester-

olemic type 2 diabetic patients, reinforcing the data already obtained in patients with higher LDL cholesterol levels (10). This result, which may be considered of small entity (a 9% reduction), is, instead, important from a clinical point of view considering the need to constantly lower LDL cholesterol values, especially in type 2 diabetic patients (6).

The only drawback of the diet rich in carbohydrate and fiber is the lower levels of fasting HDL cholesterol obtained compared with the diet low in carbohydrate and rich in MUFAs. Moreover, it is important to underline that any intervention able to reduce LDL cholesterol levels generally leads also to a reduction in HDL cholesterol. Furthermore, a previous study has shown that the decrease in HDL cholesterol after a low-fat/high-carbohydrate diet is limited to HDL₃ (17), which is the HDL subfraction with less antiatherogenic properties.

Our results emphasize the clear importance of the quality of carbohydrate, beside that of their amount (18). Indeed, the few studies that have so far looked at the effects of high-carbohydrate versus high-MUFA diets on postprandial lipid metabolism compared diets rich in MUFA with diets rich in carbohydrate, but not in

dietary fiber, and with a low glycemic index (19–21).

How can the two dietary approaches act on the postprandial response of triglyceride-rich lipoproteins? We looked at the possible effects of the two diets on lipolysis in adipose tissue, considering the crucial role of this tissue in partitioning the postprandial lipids (11). However, both LPL and HSL activities were not different at the end of either diet. This suggests that the two diets might act on other sites, particularly on those involved in the absorption of dietary fatty acids and cholesterol and the production of chylomicrons and VLDL, not only through their nutrient composition but also for their different combination of foods and for the presence of other components. On the one hand, since low-carbohydrate/high-MUFA diets are richer in the amount of fat, which is one of the main determinants of postprandial lipid response (22), they may induce a higher absorption of dietary fatty acids, which would result in a higher intestinal production of chylomicrons. On the other hand, since the high-carbohydrate/high-fiber diet is at the same time rich in carbohydrate and dietary fiber, it may act in different ways, i.e., by slowing down gastric emptying; reducing the absorption of glucose, chole-

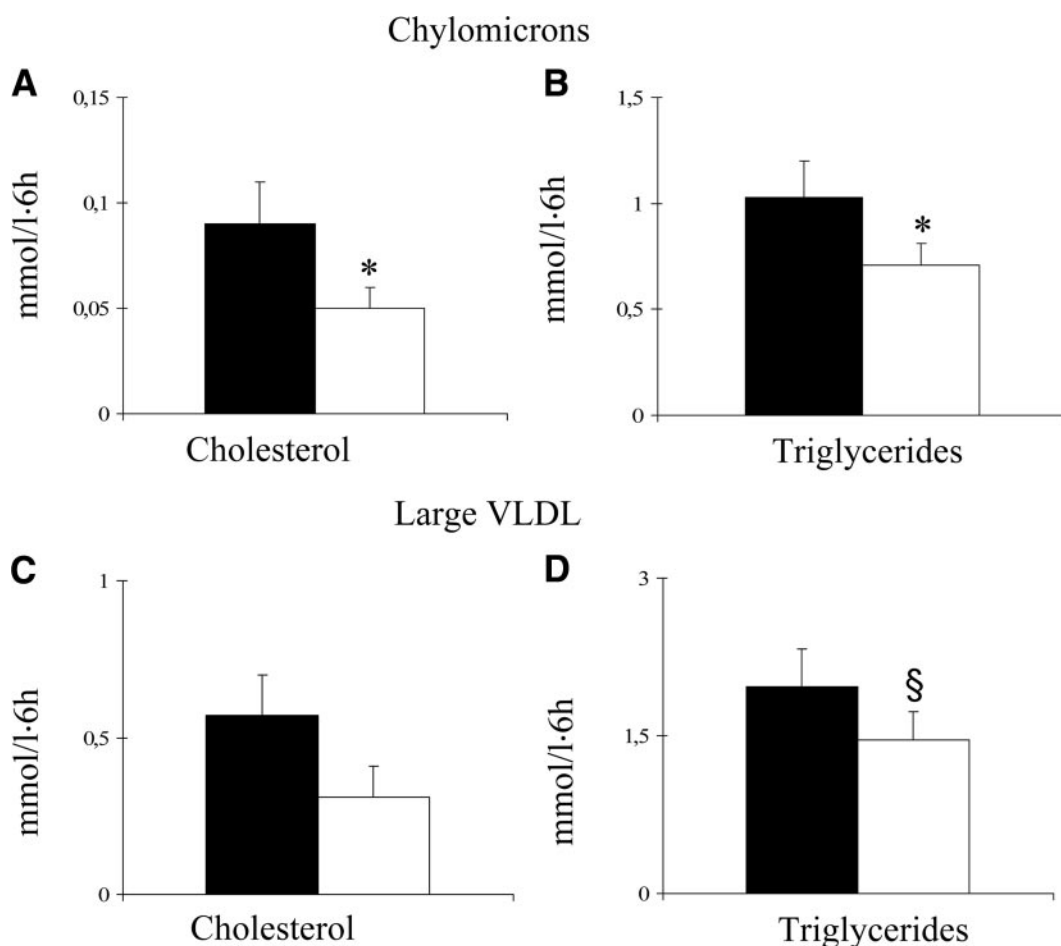


Figure 2—IAUC for cholesterol and triglycerides in chylomicrons (A and B) and large VLDL (C and D) after a high-carbohydrate/high-fiber test meal (□) or a low-carbohydrate/high-MUFA test meal (■) performed at the end of the corresponding diet (means \pm SE, * $P < 0.05$, § $P = 0.06$).

terol, and fatty acids; and, finally, reducing the intestinal production and secretion of chylomicrons, as suggested by studies performed both in vitro and in vivo (23). Moreover, since the high-carbohydrate/high-fiber diet also reduces postprandial plasma glucose and insulin, it is likely that both effects may reduce de novo lipogenesis, which is stimulated by glucose and insulin levels (23) and may be particularly relevant in type 2 diabetic patients, where it accounts for 25% of VLDL synthesis (24). Moreover, our high-carbohydrate diet, being rich in fiber, also induced an improvement in insulin resistance, as suggested by the lower insulin-to-glucose ratios, which is relevant given the well-known key role played by insulin resistance in determining postprandial lipoprotein abnormalities (25).

Clinical relevance of our results lies on the fact that postprandial lipemia is, according to recent prospective studies (1,2), an independent cardiovascular risk factor. On the basis of these studies, a dif-

ference in postprandial triglycerides of 0.25 mmol/l such as that observed between our two diets could mean a reduction in cardiovascular risk of $\sim 25\%$. It has to be underlined that our results have been obtained with a nonpharmacological intervention comparing two diets both recommended and in individuals with quite low lipid levels.

Limitations

Participants in our study were type 2 diabetic patients in relatively good blood glucose control, with quite normal plasma lipid levels, who already used a diet relatively rich in carbohydrate and fiber. Therefore, we cannot extrapolate our results to all type 2 diabetic patients. However, it has to be considered that a similar type of high-carbohydrate/high-fiber diet induced similar, if not better, results on blood glucose control and fasting lipid metabolism in type 2 diabetic patients not in satisfactory blood glucose control and with hyperlipidemia (10,18). Another

point to be stressed is the length of the intervention: although 1 month for each diet cannot be considered a long-term experiment, it is certainly sufficiently long enough to induce changes in glucose and lipid metabolism.

In conclusion, a diet relatively high in carbohydrates, rich in dietary fiber, with a relatively low glycemic index and a low glycemic load, essentially based on consumption of legumes, vegetables, fruit, and whole cereals, may be particularly useful for the treatment of type 2 diabetic patients on the basis of its multiple effects on different cardiovascular risk factors, including postprandial lipid abnormalities.

Acknowledgments—This work was supported in part by funds from “Regione Campania” (L.R. n.5/2002).

Accutrend instrument and triglycerides strips were supplied by Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). No other potential

conflicts of interest relevant to this article were reported.

The excellent technical laboratory assistance of P. Cipriano is gratefully acknowledged. The authors are grateful to R. Scala for expert linguistic revision.

References

- Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007;298:299–308
- Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007;298:309–316
- Iovine C, Vaccaro O, Gentile A, Romano G, Pisanti F, Riccardi G, Rivellese AA. Post-prandial triglyceride profile in a population-based sample of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2004;47:19–22
- Pastromas S, Terzi AB, Tousoulis D, Koulouris S. Postprandial lipemia: an under-recognized atherogenic factor in patients with diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 2008;126:3–12
- Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, Patti L, Iovine C, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Annuzzi G. Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2153–2159
- Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2008;31:S61–S78
- Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr* 2007;98:458–473
- Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blüher M, Stumvoll M, Stampfer MJ. Dietary Intervention Randomized Controlled Trial (DIRECT) Group. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med* 2008;359:229–241
- Garg A: High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1998;67:577S–582S
- Riccardi G, Rivellese AA. Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoprotein metabolism in diabetic patients. *Diabetes Care* 1991;14:1115–1125
- Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 2002;45:1201–1210
- Annuzzi G, Giacco R, Patti L, Di Marino L, De Natale C, Costabile G, Marra M, Santangelo C, Masella R, Rivellese AA. Postprandial chylomicrons and adipose tissue lipoprotein lipase are altered in type 2 diabetes independently of obesity and whole-body insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:531–538
- Rivellese AA, Giacco R, Annuzzi G, De Natale C, Patti L, Di Marino L, Minerva V, Costabile G, Santangelo C, Masella R, Riccardi G. Effects of monounsaturated vs. saturated fat on postprandial lipemia and adipose tissue lipases in type 2 diabetes. *Clin Nutr* 2008;27:133–141
- Muggeo M, Zoppini G, Bonora E, Brun E, Bonadonna RC, Moghetti P, Verlato G. Fasting plasma glucose variability predicts 10-years survival of type 2 diabetic patients. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care* 2000;23:45–50
- O'Keefe JH, Bell DS. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 2007;100:899–904
- Giacco R, Parillo M, Rivellese AA, La-sorella G, Giacco A, D'Episcopo L, Riccardi G. Long-term dietary treatment with increased amounts of fiber-rich low-glycemic index natural foods improves blood glucose control and reduces the number of hypoglycemic events in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000;23:1461–1466
- Desroches S, Paradis ME, Pérusse M, Archer WR, Bergeron J, Couture P, Bergeron N, Lamarche B. Apolipoprotein A-I, A-II, and VLDL-B-100 metabolism in men: comparison of a low-fat diet and a high-monounsaturated fatty acid diet. *J Lipid Res* 2004;45:2331–2338
- Riccardi G, Rivellese AA, Giacco R. Role of glycemic index and glycemic load in the healthy state, in prediabetes, and in diabetes. *Am J Clin Nutr* 2008;87:269S–274S
- Berglund L, Lefevre M, Ginsberg HN, Kris-Etherton PM, Elmer PJ, Stewart PW, Ershow A, Pearson TA, Dennis BH, Roheim PS, Ramakrishnan R, Reed R, Stewart K, Phillips KM; DELTA Investigators. Comparison of monounsaturated fat with carbohydrates as a replacement for saturated fat in subjects with a high metabolic risk profile: studies in the fasting and postprandial states. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1611–1620
- Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sánchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, Escoribano A, Moyano MJ, Pérez-Martínez P, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr* 2007;26:434–444
- McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Yeni-Komshian H, Reaven G. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: an insight into the link between plasma insulin and triglyceride concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3085–3088
- Dubois C, Beaumier G, Juhel C, Armand M, Portugal H, Pauli AM, Borel P, Latgé C, Lairon D. Effects of graded amounts (0–50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults. *Am J Clin Nutr* 1998;67:31–38
- Lairon D, Play B, Jourdeuil-Rahmani D. Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 2007;18:217–227
- Roberts R, Bickerton AS, Fielding BA, Blaak EE, Wagenmakers AJ, Chong MF, Gilbert M, Karpe F, Frayn KN. Reduced oxidation of dietary fat after a short term high-carbohydrate diet. *Am J Clin Nutr* 2008;87:824–831
- Adiels M, Taskinen MR, Borén J. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 2008;8:60–64

An isoenergetic MUFA diet reduces liver fat in type 2 diabetes independently of aerobic training.

Lutgarda Bozzetto MD¹, Giovanni Annuzzi MD¹, Anna Prinster ING PhD^{2,3}, Lucia Costagliola RD¹, Anna Mangione BS¹, Raffaella Mazzearella MD¹, Alessandra Vitelli MD⁴, Marco Salvatore MD⁵, Carlo Vigorito MD, Gabriele Riccardi MD², Angela A. Rivellese MD¹

¹ Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Naples, Italy.

² Department of Clinical Medicine and Cardiovascular Sciences, Federico II University, Naples, Italy.

³ Institute of Biostructure and Bioimage, National Research Council, Naples, Italy.

⁴ SDN Foundation, Institute of Diagnostic and Nuclear Development, Naples, Italy.

⁵ Department of Biomorphological and Functional Science, Federico II University, Naples, Italy.

Short title: **Dietary MUFA and liver fat.**

Corresponding author:

Angela A. Rivellese

Department of Clinical and Experimental Medicine Federico II University,

Via Pansini, 5 - 80131, Naples, Italy

Telephone number: +390817462154

Fax number: +390817462311

E-mail address: rivelles@unina.it

Word count: 3398

Table number: 3

Figure number: 1

(max 250 parole)

OBJECTIVE To evaluate the effects of qualitative dietary changes and their interaction with aerobic exercise training on liver fat content independent of weight loss in patients with type 2 diabetes.

RESEARCH DESIGN AND METHODS According to a factorial 2x2 randomized parallel group design, 37 men and 8 women, aged 35-70 years, with type 2 diabetes in satisfactory blood glucose control on diet or diet + metformin were assigned to one of the following groups for an 8-week intervention: *a.* high carbohydrate/high fibre/low glycemic index diet (CHO/fibre group), *b.* high MUFA diet (MUFA group), *c.* high carbohydrate/high fibre/low glycemic index diet plus physical activity program (CHO/fibre+Ex group), *d.* high MUFA diet plus physical activity program (MUFA+Ex group). Before and after intervention hepatic fat content was measured by H^1 -NMR.

RESULTS Hepatic fat content decreased in all groups. However, the percent decrease was significantly higher in MUFA (-29%) and MUFA+Ex (-25%) groups than in CHO/fibre (-4%) and CHO/fibre+Ex groups (-6%) ($p < 0.05$ for diet effect by two ways analysis of variance). Exercise training and its interaction with dietary changes did not significantly influence liver fat content.

CONCLUSION Isocaloric qualitative dietary changes consisting in an enrichment in MUFA determine a clinical relevant reduction of hepatic fat content in type 2 diabetes independently of aerobic training, and should be considered for the nutritional management of hepatic steatosis in people with type 2 diabetes.

Type 2 diabetes is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (1-3), a clinical condition potentially evolving in end-stage liver disease (4,5) and now recognized as an independent cardiovascular risk factor (6). Although the cause-effect relationship between type 2 diabetes and NAFLD is not clear, fatty liver (FL) and type 2 diabetes likely share pathophysiological mechanisms (7-10). Therefore, non pharmacological interventions -diet and physical activity- that improve blood glucose control and other metabolic abnormalities associated with type 2 diabetes (11,12) might be also effective in reducing liver fat.

Weight losing low-calorie diets reduce liver fat content (13-15). At comparable levels of weight loss, a post-hoc analysis revealed a lower reduction of alanine transaminases levels with a hypocaloric carbohydrate restricted diet than a fat restricted one (16). On the contrary, the only published study exploring the effects on FL of macronutrient composition in the absence of weight loss demonstrated that a high fat diet promoted liver fat deposition in obese individuals compared with a high carbohydrate diet (17).

Concerning the role of different types of fat, observational data indicate that people with NAFLD have a higher intake of saturated fatty acids and a lower consumption of omega-3 fatty acids (18). Although high monounsaturated fatty acids (MUFA) diets are a current option for diabetic patients because of their positive effects on glycemic control and LDL cholesterol levels (19), no studies have tested their effects on hepatic fat content.

A cross-sectional analysis in a population of healthy people from Northern Italy evaluated the impact of carbohydrate quality on liver fat content showing a direct relationship between glycemic index of foods and degree of hepatic steatosis (20). Since carbohydrates with low glycemic index ameliorate plasma lipid profile and insulin sensitivity it might be hypothesized that, beyond the quantity, the quality of carbohydrates may play a role in liver fat accumulation (21).

Physical activity alone or in association with caloric restriction in the presence of concomitant weight loss is effective in reducing hepatic lipid content both in obese (22,23) and diabetic subjects (23). Moreover, beneficial effects of physical activity on fat liver content have been also shown

independently of changes in body weight, by two recent interventional studies evaluating the effects of aerobic training in obese individuals (25) and resistance training in a heterogeneous group of people with clinical evidence of NAFLD (26). No data are available in individuals with type 2 diabetes. Moreover, no study has investigated the effects of the interaction of a program of physical activity with qualitative dietary changes independently of weight loss.

Therefore, the aims of this controlled randomized trial were to compare in patients with type 2 diabetes the effects on liver fat content of an 8-week isoenergetic intervention with a diet relatively rich in CHO and fibre and a low glycemic index and a diet rich in monounsaturated fat, i.e two dietary approaches generally recommended in patients with type 2 diabetes. This study also evaluated the effects on liver fat content of the addition to these diets of a structured supervised program of aerobic physical exercise.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

A total of 45 subjects (37 men and 8 postmenopausal women) with type 2 diabetes were recruited at the diabetes outpatient clinic at the Department of Internal Medicine of the University Medical School Hospital and were enrolled in the study, after giving their written informed consent. Patients were overweight or obese, without body weight changes over the previous six months, and in satisfactory blood glucose control with diet or metformin + diet, had normal fasting plasma lipid levels and were not taking any lipid lowering drug. Subjects had no evidence of A, B, C, or autoimmune hepatitis, clinical signs or symptoms of inborn errors of metabolism, history of toxins or drugs known to induce hepatitis, and history or symptoms of any known disease, apart from diabetes. Their alcohol consumption was <20 g/day. They were not vegetarians or engaged in intensive physical activity. Out of the 45 participants enrolled, 4 (one in each group) dropped out before the final examination as they moved to other cities or could no longer accomplish to their working routine. Moreover, in spite of their previous acceptance 5 subjects refused H¹NMR examination because of claustrophobia. Data in this paper refer to the 36 participants who

underwent hepatic fat measurement. The study protocol was approved by the Federico II University Ethics Committee and registered at ClinicalTrials.gov, number NCT01025856.

Sample size

In order to detect a 30% difference in liver fat content between treatments with a 80% power at 5% significance level, 40 patients had to be studied. The expected changes in liver fat content after treatment correspond to the differences observed between obese patients with or without type 2 diabetes in a previous study (3).

Study design

The intervention was preceded by a run-in period of 3 weeks during which participants were stabilized on a diet whose composition was similar to the one usually followed, only providing that saturated fatty acids were at least 13% (CHO 48%, total fat 33%, saturated fat 13%, protein 18%, of total energy intake). According to a factorial 2x2 randomized parallel group design, the participants were assigned to one of the following intervention groups for an 8-week period: *a.* high carbohydrate/high fibre/low glycemic index diet (CHO/fibre group), *b.* high MUFA diet (MUFA group), *c.* high carbohydrate/high fibre/low glycemic index diet plus physical activity program (CHO/fibre+Ex group), *d.* high MUFA diet plus physical activity program (MUFA+Ex group). The allocation to the intervention, stratified for body mass index (BMI), age, sex, and diabetes therapy (only diet or metformin), was randomly performed by minimization method (24) utilizing MINIM software (www.users.york.ac.uk). The experimental diets were isoenergetic in order to maintain body weight constant and differed for macronutrient composition: CHO 52 vs. 40%, fibre 28 vs. 10 g/1000 kcal, glycemic index (bread reference) 60 vs. 95%, fat 30 vs. 42%, MUFA 16 vs. 28%, for CHO/fibre diet and MUFA diet, respectively. The other components, including the saturated fat content (7%), were similar in the two diets. The dietary macronutrient composition was drawn by the tables of food composition from Italian National Research Institute for Food and Nutrition. (25) To improve dietary compliance, patients were seen weekly by an experienced dietitian, who made telephone calls every 2–3 days to ensure that they followed the diet assigned. Moreover, some foods

-olive oil for MUFA diet and stick bran for CHO/fibre diet- were also given to the patients.

Adherence to the dietary treatments was evaluated by a 4-day food record (2 week-end and 2 working days) filled in by the patients every second week.

The structured supervised exercise program was performed at the Heart Rehabilitation Centre of the Department of Clinical Medicine and Cardiovascular Sciences. Participants exercised on treadmill or cycle ergometer three times per week for 45 minutes plus warming up and cooling down at an intensity corresponding to 50-70% of their VO₂ max. Only the participants assigned to the exercise program received information about the benefits of physical activity and a motivational counseling. Every second week, a validated questionnaire (7-Day Physical Activity Recall) (26) was administered to all participants to quantify their daily physical activity.

Experimental procedures

All evaluations were performed before and after the 8-week intervention periods.

Anthropometrics. Body weight, height, and waist circumference were measured according to standardized procedures (27).

Liver fat. Liver fat content was measured by proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) performed on a 1.5T MR scanner (Intera; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) equipped for proton spectroscopy acquisitions. Sagittal, coronal and axial slices covering the whole liver were preliminarily taken to position the spectroscopy acquisition voxel. A single voxel of 8 cc (2 • 2 • 2 cm) was placed within the right lobe avoiding major blood vessels, intrahepatic bile ducts and subcutaneous fat tissue. The proton spectrum was acquired using the an 8-channel phased array body coil after shimming over the volume of interest using an unsuppressed water PRESS sequence with the following parameters: TR = 1200 ms, TE = 40 ms, 512 data points over 2500 KHz spectral width, 12 acquisitions. Total spectra acquisition time was 16 seconds and thus acquired in breath hold to avoid movements artifacts and spectra broadening. Spectra were analyzed using LCModel software (Version 6.2-1, <http://s-provencher.com>) that fits in vivo metabolite spectra using model resonances acquired under comparable scanning conditions from multiple

compounds in standard phantom solutions. (ref. Provencher, S.W., 2001. *Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LCModel. NMR in Biomedicine* 14, 260–264). Concentration values in arbitrary units of water peak and the sum of lipid peak at 1.3, 0.9 and 1.6 ppm were considered for fat liver quantification, including both methyl and methylene groups of triglyceride molecule. Signal decay was corrected for the different T2 decay of water and fat using mean T2 relaxation times of 50 and 60 ms for water and fat, respectively. Hepatic fat percentage was calculated using the formula: $100 \cdot S_f / (S_f + S_w)$ [...]. These values represent a relative quantity of water and fat in the volume of interest. To convert these values into absolute concentrations (w/v) expressed as percent fat, equations validated by Longo et al. [...] were applied.

Other measurements

Total cholesterol, triglyceride and glucose concentrations were assayed in plasma by enzymatic colorimetric methods (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) on an autoanalyser Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, France). LDLs were isolated from the 1006 density bottom by preparative sequential ultracentrifugation (28) for difference from precipitated HDL. Plasma insulin concentrations were measured by Enzyme Amplied Sensitivity Immuno Assay (Dia-Source, Nivelles, Belgium). HOMA-IR was calculated using the formula: fasting glucose (mg/dl) x fasting insulin (μ U/mL) / 405.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD unless otherwise stated. Differences between the four groups at baseline were tested by one-way ANOVA and post-hoc analysis. The effects of the four interventions were evaluated by two-way repeated measures ANOVA. Baseline and after treatment values were included as levels of within subjects factor (time) and type of diet and presence/absence of physical activity program as between subjects factors.

Changes in liver fat content were also evaluated as percent changes [(final values - baseline values) / baseline values \times 100] in a general linear model taking change in liver fat as dependent variable,

type of diet and presence/absence of physical activity program as fixed factors and baseline value of liver fat as covariate. A p value <0.05 was considered significant. The statistical analysis was performed according to standard methods using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

As shown in table 1 the participants allocated to the four intervention groups were comparable for age, BMI, diabetes treatment, and HbA1c.

Compliance to dietary intervention

The two diets followed by the patients were, as expected, significantly different for total fat, MUFA, carbohydrate, fiber, glycemic index, and glycemic load (Table 2). The MUFA diet was richer in vitamin E, while the CHO/fibre diet was richer in polyphenols and had a higher Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) than MUFA diet (Table 2). Both diets were well accepted by the patients. Participants allocated to CHO diet were considered compliant to the treatment if CHO intake was at least 50% of total energy, glycemic index less than 64%, and daily fiber intake at least 40 g; participants allocated to MUFA diet were considered compliant if CHO intake was less than 45% of total energy, glycemic index was more than 86%, and MUFA proportion was at least 25% of total energy. All subjects allocated to MUFA diet satisfied the adherence criteria. One patient allocated to CHO/fibre group was considered not compliant since its glycemic index was higher than accepted (70%). This subject was excluded from the analysis of liver fat change. Body weight and waist circumference did not change during intervention in the 4 groups (table 3).

Compliance to exercise training

Patients allocated to the exercise groups were considered compliant to the treatment if they attended at least 70% of prescribed training sessions. Because of employment schedule changes, 2 patients in the MUFA+Ex group and 1 in the CHO/fibre+Ex group did not satisfy compliance criteria. One patient allocated to CHO/fibre+Ex trained at a lower intensity than planned because of difficulties

in exercising on the treadmill. Results were similar by including or not these 4 subjects and therefore we reported results on all subjects. There were no differences between groups in the level of daily physical activity as measured by the 7-Day Physical Activity Recall questionnaire. Training induced a significant increase in VO₂peak in the subjects allocated to MUFA+Ex group while not in the CHO/fibre+Ex group (Table 3). Results were not changed by excluding non compliant participants (MUFA+Ex group 16.4 ± 1.8 vs. 18.2 ± 2.2 , $p=0.007$; and CHO/fibre+Ex 14.5 ± 3.7 vs. 14.6 ± 4.5 , $p=0.762$).

Plasma lipids and HbA1c

Fasting plasma concentrations of total, LDL and HDL cholesterol and triglyceride did not change at the end of the interventions (Table 3). Blood glucose control as shown by HbA1c levels significantly improved in the MUFA group, while did not change in the other groups (Table 3).

Liver fat

Liver fat content measured by H¹NMR significantly decreased in MUFA+Ex group (11.6 ± 8.0 vs. $9.1 \pm 7.4\%$; $p=0.02$) and MUFA group (7.4 ± 2.8 vs. $5.2 \pm 2.7\%$; $p=0.01$); it did not change significantly in CHO/fibre+Ex group (8.8 ± 4.9 vs. $8.9 \pm 5.7\%$; $p=0.794$) and CHO/fibre group (17.7 ± 9.7 vs. $16 \pm 6.8\%$; $p=0.295$). In order to correct for the baseline differences in liver fat content among groups, we also evaluated their percent variations. A general linear model revealed that diet but not physical activity or the interaction diet x physical activity influenced liver fat content (Fig.1). Hepatic fat was reduced by the MUFA diet with (-25%) and without (-29%) exercise significantly more than by CHO diet with (-6%) and without (-4%) exercise ($p<0.05$).

DISCUSSION

This is the first randomized intervention study evaluating the effects of qualitative dietary changes and their interaction with aerobic exercise on liver fat content in type 2 diabetes patients, in the absence of weight loss. We evaluated the effects on liver fat of the two most recommended dietary

approaches to diabetes, i.e. a relatively high-CHO/high-fibre/low-glycemic index diet and a high-MUFA diet with and without the association of a structured physical activity program. Hepatic fat content significantly decreased after the 8-week intervention with MUFA diet independently of exercise. This decrease was clinically relevant (-29%), showing that also qualitative isocaloric dietary modifications may positively influence FL.

In the present study the MUFA diet differed from the CHO/fibre diet for the high fat content (40% of total energy) due to the high proportion of MUFA (28 vs. 16%). In the only published isocaloric dietary intervention on FL in overweight non diabetic women, a high fat diet (56%) significantly increased the hepatic fat content compared to a low fat/high carbohydrate diet (17). The extreme increase in fat was mainly due to saturated fatty acids. This indicates that both the quantity and the quality of dietary fat have a role in the pathogenesis of FL. Differential effects of the type of fatty acids on direct measures of liver fat content have been reported only in animal studies. In mice without FL an olive oil rich diet increased hepatic triacylglycerol content compared to corn oil (29), while in a rat model of NAFLD olive oil decreased the accumulation of triglyceride in the liver significantly more than fish oil and butter (30).

MUFAs may exert their beneficial effects on hepatic fat content through their influence on lipid metabolism in the liver or on abdominal adipose tissue. Since in the postprandial phase MUFAs are more rapidly oxidized than saturated fatty acids (31-33), a high MUFA diet may avoid fat deposition in liver by the activation of catabolic pathways. In addition, MUFAs could favor fatty acid deposition in adipose tissue rather than in liver, enhancing the clearance of circulating triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase (LPL). We demonstrated in a previous study (34) that a MUFA rich diet stimulated the activity of LPL more than a saturated fat rich diet. There is also evidence that MUFAs are preferentially taken up by adipose tissue and muscles because of their greater affinity for the fatty acid transporters (35). MUFAs may also improve hepatic steatosis by positively influencing adipose tissue cross-talk with liver metabolism through regulation of adipokines and inflammatory markers synthesis. In fact, in obese women hepatic fat content is

associated with increased concentrations of ceramide and inflammatory mediators in subcutaneous adipose tissue (36), and in cultured cells saturated fatty acids are preferentially stored as diacylglycerol and ceramides at difference with MUFA that are, instead, preferentially incorporated in triacylglycerols (35). The effects of the MUFA diet did not seem to be mediated and/or lead to changes in insulin-resistance since no significant changes in HOMA index were observed. However, this index may not be a good marker of overall insulin resistance in patients with diabetes and, in addition, we had no measures of hepatic insulin sensitivity.

In this study the MUFA diet had a higher content of vitamin E, which was shown to induce a reduction in hepatic steatosis in obese non diabetic patients (37), while not significantly modify histologic features of NAFLD in obese children and adolescents (38). However, it is unlikely that in our study the antioxidant effects of vitamin E were responsible for the effects of the MUFA diet because of the much bigger difference in antioxidant capacity between the two diets shown by the higher ORAC levels and higher concentrations of polyphenols and vitamin C in the CHO/fiber diet. A relevant finding of our study is that carbohydrate quality influences the accumulation of fat in the liver. In fact, the high-fibre low-glycemic index diet did not increase liver fat content, while an increase in liver fat has been repeatedly associated with high-CHO diets in previous studies where carbohydrates mainly consisted in fructose, simple sugars or high-glycemic index foods (21). To date only one study in mice fed diets differing only for starch content has compared the effects of high and low glycemic index diets, showing that hepatic steatosis increased more with rapidly than slowly absorbed carbohydrate (39). This is in line with the fact that, although dietary carbohydrates may stimulate hepatic de novo lipogenesis leading to fasting hypertriglyceridemia and hepatic fat accumulation (40), the eucaloric substitution of dietary starch for sugar reduces hepatic lipogenesis (41). Therefore, carbohydrates with high and low glycemic index may differently influence hepatic fat deposition through a dissimilar influence on fatty acids synthetic pathways in the liver. The relationship between quality of ingested carbohydrates and FL may also be mediated by changes in gut microbiota due to different modalities of intestinal absorption. Intestinal flora is related with

obesity and metabolic diseases and the microbial species hosted in our intestine may influence metabolite absorption and liver fat metabolism (42,43).

The effects on FL observed in the present study were independent of the exercise training program. In fact, neither physical activity alone or its interaction with diet influenced hepatic fat content. In the only intervention trial that explored the effects of aerobic physical activity, independent of weight loss, it was observed a 20% reduction in liver fat content (44,45). Differing from our study, this trial was conducted in non diabetic patients with a higher exercise capacity ($VO_{2peak} \approx 25$ vs. 15 ml/kg/min). Previous data support the hypothesis that type 2 diabetes may confer a sort of resistance to the beneficial effects of physical activity (46). A recent study evaluating the effects of exercise training on fructose-induced liver fat accumulation in rats showed that physical activity did not reduce hepatic fat content, although it beneficially modified the partitioning of lipids providing more unsaturated fatty acids in liver (47). Because of these inconsistencies, more data are needed to elucidate the role of physical activity on liver fat content in type 2 diabetes.

This study has some strengths and limitations. This is an interventional randomized controlled trial with a rigorous follow up of dietary adherence and direct supervision of physical exercise. Hepatic fat content was measured by the gold standard 1H MR spectroscopy. A limitation is that only patients in good metabolic control were studied and therefore our results may not be extended to all type 2 diabetes patients. Nevertheless, there are no indications that a worse metabolic control could negatively influence the effects of MUFAs on hepatic fat content.

In conclusion, this study demonstrates for the first time that qualitative dietary changes without weight loss can beneficially influence hepatic fat content in type 2 diabetes patients. These results are clinically relevant and have implications in the nutritional management of fatty liver in type 2 diabetes suggesting that a MUFA rich diet with foods particularly rich in fibre and with low glycemic index should be preferred. Studies are needed to elucidate the mechanisms underlying these dietary effects and consequently the development of fatty liver disease in type 2 diabetes.

Acknowledgments

Writing of manuscripts (LB, GA, AAR,), design of experiment (LB, GA, AAR, CV, GR), collection and analysis of data (LB, RM, LC, AV, ST), fat liver spectra acquisition and quantification (AP, ML, MM), biochemical measurements (AM), dietary counseling (LC), exercise training supervision (AV, CV).

Reference List

1. Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RA, Kuller LH, Kalhan SC: Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E906-E916, 2003
2. Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H: Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 31:165-169, 2008
3. Bozzetto L, Prinster A, Mancini M, Giacco R, De NC, Salvatore M, Riccardi G, Rivellese AA, Annuzzi G: Liver fat in obesity: role of type 2 diabetes mellitus and adipose tissue distribution. *Eur J Clin Invest* 41:39-44, 2011
4. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA: Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 107:1103-1109, 1994
5. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW: The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 11:74-80, 1990
6. Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, Zenari L, Falezza G: Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* 54:3541-3546, 2005
7. Adiels M, Taskinen MR, Boren J: Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 8:60-64, 2008
8. Kotronen A, Seppala-Lindroos A, Bergholm R, Yki-Jarvinen H: Tissue specificity of insulin resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 51:130-138, 2008
9. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H: Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3023-3028, 2002
10. Kelley DE, Kuller LH, McKolanis TM, Harper P, Mancino J, Kalhan S: Effects of moderate weight loss and orlistat on insulin resistance, regional adiposity, and fatty acids in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:33-40, 2004
11. Bantle JP, Wylie-Rosett J, Albright AL, Apovian CM, Clark NG, Franz MJ, Hoogwerf BJ, Lichtenstein AH, Mayer-Davis E, Mooradian AD, Wheeler ML: Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 31 Suppl 1:S61-S78, 2008
12. Marwick TH, Hordern MD, Miller T, Chyun DA, Bertoni AG, Blumenthal RS, Philippides G, Rocchini A: Exercise training for type 2 diabetes mellitus: impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 119:3244-3262, 2009

13. Vitola BE, Deivanayagam S, Stein RI, Mohammed BS, Magkos F, Kirk EP, Klein S: Weight loss reduces liver fat and improves hepatic and skeletal muscle insulin sensitivity in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 17:1744-1748, 2009
14. Ueno T, Sata M, Sakata R, Torimura T, Sakamoto M, Sugawara H, Tanikawa K: Hepatic stellate cells and intralobular innervation in human liver cirrhosis. *Hum Pathol* 28:953-959, 1997
15. Huang MA, Greenson JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, Emick D, Lok AS, Conjeevaram HS: One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 100:1072-1081, 2005
16. Ryan MC, Abbasi F, Lamendola C, Carter S, McLaughlin TL: Serum alanine aminotransferase levels decrease further with carbohydrate than fat restriction in insulin-resistant adults. *Diabetes Care* 30:1075-1080, 2007
17. Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, Rissanen A, Salminen I, Aro A, Yki-Jarvinen H: Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2804-2809, 2005
18. Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, Raman M, Avand G, Arendt BM, Jalali P, Kandasamy T, Prayitno N, Sherman M, Guindi M, Ma DW, Heathcote JE: Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *J Hepatol* 48:300-307, 2008
19. Gerhard GT, Ahmann A, Meeuws K, McMurry MP, Duell PB, Connor WE: Effects of a low-fat diet compared with those of a high-monounsaturated fat diet on body weight, plasma lipids and lipoproteins, and glycemic control in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 80:668-673, 2004
20. Valtuena S, Pellegrini N, Ardigo D, Del RD, Numeroso F, Scazzina F, Monti L, Zavaroni I, Brighenti F: Dietary glycemic index and liver steatosis. *Am J Clin Nutr* 84:136-142, 2006
21. Zelber-Sagi S, Ratzin V, Oren R: Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 17:3377-3389, 2011
22. Perseghin G, Lattuada G, De CF, Ragogna F, Ntali G, Esposito A, Belloni E, Canu T, Terruzzi I, Scifo P, Del MA, Luzi L: Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. *Diabetes Care* 30:683-688, 2007
23. Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, Choi JB, Watada H, Niwa M, Kinoshita J, Ooka A, Kumashiro N, Igarashi Y, Kyogoku S, Maehara T, Kawasumi M, Hirose T, Kawamori R: Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3191-3196, 2005
24. Scott NW, McPherson GC, Ramsay CR, Campbell MK: The method of minimization for allocation to clinical trials. a review. *Control Clin Trials* 23:662-674, 2002
25. Carnovale E, Marletta L, and Miuccio F. Tabelle di composizione degli alimenti. Istituto Nazionale della Nutrizione. 1995. Roma.
26. Richardson MT, Ainsworth BE, Jacobs DR, Leon AS: Validation of the Stanford 7-day recall to assess habitual physical activity. *Ann Epidemiol* 11:145-153, 2001
27. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res* 6 Suppl 2:51S-209S, 1998

28. Carlson K: Lipoprotein fractionation. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)* 5:32-37, 1973
29. Ferramosca A, Savy V, Zara V: Olive oil increases the hepatic triacylglycerol content in mice by a distinct influence on the synthesis and oxidation of fatty acids. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:62-69, 2008
30. Hussein O, Grosovski M, Lasri E, Svalb S, Ravid U, Assy N: Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* 13:361-368, 2007
31. Jones PJ, Pencharz PB, Clandinin MT: Whole body oxidation of dietary fatty acids: implications for energy utilization. *Am J Clin Nutr* 42:769-777, 1985
32. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA: Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* 72:905-911, 2000
33. Schmidt DE, Allred JB, Kien CL: Fractional oxidation of chylomicron-derived oleate is greater than that of palmitate in healthy adults fed frequent small meals. *J Lipid Res* 40:2322-2332, 1999
34. Rivellese AA, Giacco R, Annuzzi G, De NC, Patti L, Di ML, Minerva V, Costabile G, Santangelo C, Masella R, Riccardi G: Effects of monounsaturated vs. saturated fat on postprandial lipemia and adipose tissue lipases in type 2 diabetes. *Clin Nutr* 27:133-141, 2008
35. Bessesen DH, Vensor SH, Jackman MR: Trafficking of dietary oleic, linolenic, and stearic acids in fasted or fed lean rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E1124-E1132, 2000
36. Kolak M, Westerbacka J, Velagapudi VR, Wagsater D, Yetukuri L, Makkonen J, Rissanen A, Hakkinen AM, Lindell M, Bergholm R, Hamsten A, Eriksson P, Fisher RM, Oresic M, Yki-Jarvinen H: Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. *Diabetes* 56:1960-1968, 2007
37. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van NM, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR: Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 362:1675-1685, 2010
38. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, Abrams SH, Scheimann AO, Sanyal AJ, Chalasani N, Tonascia J, Unalp A, Clark JM, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR: Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA* 305:1659-1668, 2011
39. Scribner KB, Pawlak DB, Ludwig DS: Hepatic steatosis and increased adiposity in mice consuming rapidly vs. slowly absorbed carbohydrate. *Obesity (Silver Spring)* 15:2190-2199, 2007
40. Parks EJ, Krauss RM, Christiansen MP, Neese RA, Hellerstein MK: Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production, and clearance. *J Clin Invest* 104:1087-1096, 1999
41. Hudgins LC, Seidman CE, Diakun J, Hirsch J: Human fatty acid synthesis is reduced after the substitution of dietary starch for sugar. *Am J Clin Nutr* 67:631-639, 1998
42. Cani PD, Delzenne NM: The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 15:1546-1558, 2009

43. Musso G, Gambino R, Cassader M: Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol* 21:76-83, 2010
44. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, Thoma C, Moore S, Taylor R, Day CP, Trenell MI: Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut* 60:1278-1283, 2011
45. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J: Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 50:1105-1112, 2009
46. Burns N, Finucane FM, Hatunic M, Gilman M, Murphy M, Gasparro D, Mari A, Gastaldelli A, Nolan JJ: Early-onset type 2 diabetes in obese white subjects is characterised by a marked defect in beta cell insulin secretion, severe insulin resistance and a lack of response to aerobic exercise training. *Diabetologia* 50:1500-1508, 2007
47. Yasari S, Prud'homme D, Tesson F, Jankowski M, Gutkowska J, Levy E, Lavoie JM: Effects of exercise training on molecular markers of lipogenesis and lipid partitioning in fructose-induced liver fat accumulation. *J Nutr Metab* 2012:181687, 2012

Table 1 Baseline characteristics of the type 2 diabetes subjects participating in the study.

	CHO/fibre	MUFA	CHO/fibre+Ex	MUFA+Ex
Participants (M/F)	7/2	6/2	7/3	9/0
Age (years)	58±5	57±8	63±5	57±9
BMI (kg/m ²)	30±2	28±3	31±3	30±4
HbA1c (%)	6.3±0.3	6.6±0.8	6.5±0.7	6.9±0.6
Diabetes therapy (Diet /Metformin)	3/6	3/5	2/8	2/7

CHO: carbohydrates; MUFA : monounsaturated fatty acids.

Table 2. Dietary composition during the 8-week intervention in the four groups of subjects.

	CHO/fibre	MUFA	CHO/fibre+Ex	MUFA+Ex
Total Energy Intake (kcal/die)	1873±407	2039±431	2037±456	2480±362*
Proteins (% TE)	19±2	18±2	18±1	18±1
Fat (% TE)	28±1	42±1 [†]	29±1	42±2 [†]
<i>Saturated</i> (% TE)	6.0±0.8	6.7±0.5	6.2±0.8	6.7±0.5
<i>Monounsaturated</i> (% TE)	16±1	27±1 [†]	17±1	28±1 [†]
<i>Polyunsaturated</i> (% TE)	3.8±0.5	4.6±0.5	3.7±0.2	4.5±0.6
Carbohydrates (% TE)	53±2	40±1 [†]	53±1	40±1 [†]
Fibre (g/1000 kcal)	26±4	9±1 [†]	26±2	8±2 [†]
Glycemic index (%)	60±3	94±5 [†]	59±1	92±4 [†]
Glycemic load	15651±3712	20326±4507 [†]	16183±3457	24469±4338 [†]
Polyphenols (mg/die)	88±29	62±25 [†]	126±49	60±23 [†]
Total ORAC (mmolTE/100 g)	13886±5820	9657±2670 [†]	18149±4612	9362±2622 [†]
Vitamin C (mg/die)	241±113	134±51 [†]	269±102	128±40 [†]
Vitamin E (mg/die)	16±5	22±5 [†]	17±4	27±3 [†]

CHO: carbohydrates; MUFA: monounsaturated fatty acids; ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

* p<0.05 vs. other groups; † p<0.05 vs. CHO/fibre and CHO/fibre +Ex by one way ANOVA post hoc analysis

Table 3 - Anthropometrics, metabolic characteristics, aerobic capacity and liver fat before and after the 8-week interventions in the four groups.

	CHO/fibre		MUFA		CHO/fibre +Ex		MUFA+Ex	
	Baseline	End	Baseline	End	Baseline	End	Baseline	End
Body weight (kg)	85±13	85±13	79±13	79±13	83±13	83±13	87±13	87±13
Waist circumference (cm)	103±6	104±6	100±8	99±8	101±8	101±8	104±11	103±10
Plasma total cholesterol (mg/dl)	157±38	164±46	167±25	166±23	175±39	176±36	171±37	168±39
HDL cholesterol (mg/dl)	37±8	37±7	35±6	36±4	44±11	49±21	40±7	39±6
LDL cholesterol (mg/dl)	98±29	107±40	110±20	109±21	116±36	121±35	110±29	111±30
Plasma triglycerides (mg/dl)	110±68	131±106	122±37	114±33	90±26	100±30	126±104	102±70
Peak VO2 (ml/kg/min)	16±4	16±4	15±3	15±4	14±4	14±4	17±2	18±2*
HbA1c (%) †	6.3±0.3	6.3±0.4	6.7±1	6.2±0.7*	6.5±0.7	6.5±0.8	6.9±0.6	6.8±0.5
HOMA-IR	4.8±1.8	5.2±1.2	3.6±1.5	3.9±2.0	5.1±1.6	5.4±2.9	4.2±1.2	4.0±1.6
Liver fat (%) †	17.7±9.7‡	16.1±6.8	7.4±2.8	5.2±2.7*	8.8±4.9	8.9±5.7	11.6±8.0	9.1±7.4*

CHO: carbohydrates; MUFA: monounsaturated fatty acids; † p<0.05 for diet x time effect by repeated measures analysis of variance; * p<0.05 vs. baseline; ‡p<0.05 vs. MUFA and CHO/fibre+Ex baseline values.

Figure legend.

Figure 1. Percent changes in liver fat content after intervention in the four groups; Data are expressed as $M \pm SE$; $p < 0.05$ for diet effect; NS for exercise effect; NS for interaction effect by general linear model.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Ezetimibe beneficially influences fasting and postprandial triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes

Lutgarda Bozzetto, Giovanni Annuzzi, Giuseppina Della Corte, Lidia Patti, Paola Cipriano, Anna Mangione, Gabriele Riccardi, Angela A. Rivellese*

Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Naples, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2010
Received in revised form 17 February 2011
Accepted 8 March 2011
Available online 15 March 2011

Keywords:

Ezetimibe
Postprandial lipaemia
Triglyceride-rich lipoproteins
Type 2 diabetes
Insulin sensitivity

ABSTRACT

Introduction: Type 2 diabetes is associated with atherogenic abnormalities of postprandial triglyceride-rich lipoproteins. This study evaluated whether ezetimibe, by inhibiting intestinal cholesterol absorption, influences chylomicrons and VLDL particles at fasting and after a standard meal.

Methods: By a double blind cross-over design 15 subjects with type 2 diabetes and hypercholesterolaemia followed in random order a 6-week treatment with ezetimibe 10 mg + simvastatin 20 mg (EZE+S) or placebo + simvastatin 20 mg (P+S) and, after a 6-week wash-out period, crossed over to the other treatment (NCT00699023). At the end of each period lipids, apoB-48, and apoB-100 concentrations in plasma and lipoprotein fractions (separated by discontinuous density gradient ultracentrifugation) were determined before and over 6 h following a high-fat test meal.

Results: Compared with P+S, EZE+S induced, (a) beside a greater decrease in LDL cholesterol, (b) a significant decrease in chylomicron lipid content both at fasting and postprandially (4.4 ± 2.7 vs. 8.3 ± 8.7 mg/dl \times 6 h total AUC for cholesterol, $p < 0.05$; 18 ± 12 vs. 29 ± 24 mg/dl triglyceride concentrations at 6 h, $p < 0.05$), (c) a significant decrease in chylomicron postprandial apoB-48 (0.03 ± 0.03 vs. 0.09 ± 0.08 mg/l at 4 h, $p < 0.05$), and (d) significant fasting and postprandial decreases in the cholesterol content of VLDL, IDL, and LDL, as shown by the significant reduction of the cholesterol/triglyceride ratio in these lipoproteins.

Conclusions: A 6-week treatment with ezetimibe and simvastatin, compared to simvastatin alone, positively influences lipoprotein profile both at fasting and postprandially in type 2 diabetic patients by favouring the production of cholesterol-poor chylomicrons and VLDL particles that have less atherogenic potential.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 2 diabetes is associated with abnormalities in postprandial lipaemia that represent an independent cardiovascular risk factor [1]. Due to their increased production and prolonged residence time, cholesterol-enriched chylomicron remnants, are likely the most relevant of these alterations, since they can reach the subendothelial compartment of the arterial wall and favour the atherosclerotic process [2]. Furthermore, patients with type 2 diabetes show a persistent, significant increase in chylomicrons even in fasting conditions [3,4], causing a constant exposure of their vessels to these highly atherogenic particles.

The mechanisms of fasting and postprandial increases in intestine-derived lipoproteins in individuals with diabetes are not fully understood. A key role seems to be played by the slower clearance of these particles due either to substrates overflow into the catabolic pathways, i.e. competition for lipoprotein lipase (LPL), which is associated with insulin-resistance [5], and/or a reduced activity of LPL specifically related to type 2 diabetes [6]. It is less known if an increased production of intestine-derived lipoproteins, induced by different mechanisms such as increased absorption of dietary cholesterol [7] and gut insulin-resistance [8], is also involved in the pathogenesis of these alterations. Kinetics studies in humans show that both increased secretion and reduced catabolism lead to over-accumulation of apoB-48 containing lipoproteins in patients with type 2 diabetes [9].

Ezetimibe is a hypocholesterolemic drug that acts through a selective inhibition of intestinal cholesterol absorption [10]. Beside the rather well documented effect of this drug on LDL cholesterol levels, especially when given in association with statins [11], an additional relevant effect related to its mechanism of action might

* Corresponding author at: Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Via S. Pansini 5, 80131 Naples, Italy. Tel.: +39 0817462154; fax: +39 0815466152.

E-mail address: rivelles@unina.it (A.A. Rivellese).

be the reduction of the cholesterol content of chylomicrons. Furthermore, since ezetimibe reduces cholesterol availability for VLDL endogenous synthesis in the liver [12], cholesterol-poor VLDL could be produced, leading to a reduction in the circulation of potentially atherogenic endogenous remnant particles.

These potential effects of ezetimibe have been scarcely evaluated. An acute study in animals [13] and very few studies in humans have produced contradictory results [14,15] and no data are available in patients with type 2 diabetes.

Therefore, the aim of this controlled double blind randomized study was to compare, for the first time, the effects of a 6-week treatment with ezetimibe 10 mg + simvastatin 20 mg (hereafter indicated as ezetimibe) versus a 6-week treatment with placebo + simvastatin 20 mg (hereafter indicated as placebo) on intestinal and hepatic derived triglyceride-rich lipoproteins both at fasting and in the postprandial period in patients with type 2 diabetes.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Fifteen subjects (twelve men and three post-menopausal women), aged 55 ± 5 years ($M \pm SD$), with type 2 diabetes in satisfactory blood glucose control ($HbA1c$ $6.6 \pm 0.7\%$), without sign or symptoms of initial neuropathy or gastroparesis or of any other diabetes complication, with LDL cholesterol >130 mg/dl, and plasma triglycerides <400 mg/dl were recruited at the diabetes outpatient clinic of our department and participated in the study after giving their written informed consent. Two participants were on diet only and 13 on diet + metformin. Diet and metformin dosage were not changed all over the study period. They were not taking any hypolipidaemic drug and had not experienced body weight changes over the previous six months. Subjects had no history or symptoms of any known disease, apart from diabetes, nor were they vegetarians or engaged in intensive physical activity. The study protocol was approved by the Federico II University Ethics Committee and registered at ClinicalTrials.gov, NCT00699023.

2.2. Sample size

In order to detect a 30% difference between treatments, which corresponds to the difference in cholesterol concentrations of chylomicron and VLDL fractions after a fat-rich meal between type 2 diabetic patients and healthy controls in a previous study [3], with a 80% power at 5% significance level, 13 patients had to be studied.

2.3. Study design

The study was performed according to a randomized double blind, cross-over design. After a run-in period of 3 weeks, during which patients were stabilized on their isoenergetic diet, they were randomly assigned to take for 6 weeks ezetimibe 10 mg + simvastatin 20 mg, or placebo + simvastatin 20 mg once a day at bedtime. Thereafter, after a 6-week washout period, they crossed over to the other treatment for an additional 6 weeks. The tablets were given to the patients stored in two boxes, one of which was labelled and contained simvastatin 20 mg and the other was unlabelled and contained placebo or ezetimibe 10 mg. The number of tablets used was calculated at each visit. Dietary composition, level of physical activity, smoking habits and all other concurrent medications were maintained unchanged throughout the whole study period.

At the beginning and at the end of the two treatments fasting concentrations of plasma cholesterol and triglycerides, and HDL

cholesterol were determined, and LDL cholesterol was calculated by the Friedewald formula.

At the end of each treatment period, after an overnight fast, the participants consumed a fat-rich test meal consisting of a pie made of mashed potato, whole milk, eggs, cheese, ham, and butter (total energy 944 kcal, carbohydrates 31% of the total energy, total fat 57%, saturated fat 34%, protein 12%). Before and 2, 4, and 6 h after meal blood samples were taken for the determination of glucose and insulin in plasma, and of cholesterol, triglycerides, apoB-48 and apoB-100 in both plasma and lipoprotein fractions.

2.4. Biochemical measurements

All laboratory measurements were made blind to the treatments.

Lipoprotein separation: For plasma separation, blood samples were centrifuged for 10 min at 3000 rpm and were kept at 4°C before, during, and after centrifugation. Fasting and postprandial lipoprotein subfractions were isolated from plasma by discontinuous density gradient ultracentrifugation, as previously described [16]. Briefly, chylomicrons (Svedberg flotation unit, $Sf >400$), large VLDL (Sf 60–400), and small VLDL (Sf 20–60) were separated by three consecutive runs at 15°C and at 40,000 rpm. Intermediate density lipoproteins (Sf 12–20) and LDL (Sf 0–12) were recuperated from the gradient after the Sf 20–60 particles had been collected. HDL were isolated by a precipitation method.

ApoB-100 and apoB-48: ApoB-100 concentrations were analyzed in total plasma and chylomicrons, large VLDL, small VLDL, IDL, and LDL, by an immunoturbidimetric assay (Horiba Medical-Italia, Roma, Italy) automated on a Cobas-Mira Autoanalyzer (ABX Diagnostics, Montpellier, France) [17]. ApoB-48 concentrations were analyzed in plasma and lipoprotein subfractions (chylomicrons, large VLDL, and small VLDL) by an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Shibayagi Co., Ltd., Shibukawa, Gunma, Japan), automated on an EtiStar ELISA autoanalyzer (DiaSorin S.p.A., Vercelli, Italy) [18].

Other measurements: Cholesterol, triglyceride, and glucose concentrations were assayed by enzymatic colorimetric methods; plasma insulin concentrations were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (DIAsource ImmunoAssay S.A., Nivelles, Belgium). ApoB-100 and apoB-48 in lipoprotein fractions were evaluated only in 13 subjects because of technical problems.

2.5. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD unless otherwise stated. Postprandial total (tAUC) and incremental (iAUC) areas under the curve were calculated by the trapezoidal method. Differences between the two treatments were evaluated by ANOVA for repeated measures and *t*-test for paired data. Two-tailed tests were used and a $p < 0.05$ was considered statistically significant. Variables not normally distributed were analyzed after logarithmic transformation or by nonparametric tests. No carry-over effect was detectable, and therefore the results for each treatment period were combined for analysis. The statistical analysis was performed according to standard methods using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Plasma lipids at baseline and at the end of treatments

As shown in Table 1, fasting plasma concentrations of total and LDL cholesterol decreased after both treatments but this reduction was significantly greater after ezetimibe than after placebo ($p < 0.05$). Plasma triglycerides significantly decreased only after

Table 1

Fasting plasma lipid concentrations (mg/dl) at the beginning and at the end of the two treatments.

	Placebo + simvastatin			Ezetimibe + simvastatin		
	Baseline	6-week	Delta	Baseline	6-week	Delta
Total cholesterol	215 ± 28	147 ± 23*	−68 ± 22	216 ± 29	124 ± 17*	−91 ± 21 [§]
LDL cholesterol	145 ± 26	75 ± 21*	−70 ± 20	144 ± 24	56 ± 13*	−88 ± 19 [§]
HDL cholesterol	44 ± 10	42 ± 9	−1.2 ± 6	43 ± 10	41 ± 9	−1.6 ± 4
Triglycerides	132 ± 66	122 ± 94	−10 ± 79	142 ± 64	98 ± 44**	−45 ± 34

Mean ± SD.

* $p < 0.05$.** $p < 0.001$ vs. baseline.§ $p < 0.05$ vs. placebo + simvastatin.

ezetimibe ($p < 0.001$). HDL cholesterol did not change after either treatment.

3.2. Test meal

3.2.1. Whole plasma

Plasma cholesterol concentrations in the postprandial phase were lower after ezetimibe with a significant difference in the tAUC (735 ± 120 vs. 883 ± 134 mg/ml \times 6 h; $p < 0.001$) as shown in Table 2. Plasma triglycerides, instead, were not significantly different at the end of the two treatments (tAUC: 885 ± 405 vs. 997 ± 634 mg/ml \times 6 h) (Table 2). ApoB-100 levels were significantly lower after ezetimibe than after placebo both at fasting (606 ± 110 vs. 734 ± 134 mg/l, $p < 0.05$) and all over the postprandial phase (tAUC: 3591 ± 646 vs. 4337 ± 798 mg/l/6 h; $p < 0.001$) (Table 2). No differences were detected in ApoB-48 concentrations at fasting (3.7 ± 3.0 vs. 5.5 ± 7.4 mg/l) and in the postprandial phase (Fig. 2, Table 2). No significant differences in iAUC for lipids and apoBs were observed.

3.2.2. Lipoproteins

Chylomicrons: Cholesterol content of chylomicrons was significantly lower after ezetimibe than placebo already before the meal and this difference remained statistically significant all over the postprandial phase ($p < 0.05$) at each time point (Fig. 1) and as tAUC (Table 2). Chylomicron triglycerides were lower after ezetimibe than after placebo ($p < 0.05$ at fasting and 6 h after meal) with no significant differences in tAUC (Fig. 1, Table 2). The cholesterol/triglyceride ratio was significantly lower at the end of treatment with ezetimibe than with placebo ($p < 0.05$ at each time point) (Fig. 1). ApoB-100 concentrations were undetectable at fasting and after the meal. ApoB-48 content was not significantly different at fasting (0.005 ± 0.07 vs. 0.01 ± 0.03 mg/l) but was lower in the postprandial phase after ezetimibe than after placebo, reaching statistical significance at 4 h ($p < 0.05$) (Fig. 1). The apoB-48 tAUCs were not significantly different (Table 2). No significant differences in iAUC for lipids and apoBs were observed.

Large VLDL: Cholesterol content of large VLDL was lower after ezetimibe treatment than after placebo with a significant difference 4 and 6 h after the meal (Fig. 2). Triglyceride concentrations were not significantly different (Fig. 2). The cholesterol/triglyceride ratio was significantly lower with ezetimibe than with placebo before the meal and all through the postprandial phase (Fig. 2). ApoB-48 and apoB-100 concentrations were not significantly different at the end of either treatment (Table 2). No significant differences in iAUC for lipids and apoBs were observed.

Small VLDL: Lipids and B apolipoproteins in small VLDL were not different at the end of either treatment, either at single time points (Fig. 2) or as incremental and total AUCs (Table 2). Only cholesterol/triglycerides ratio was significantly lower after ezetimibe than after placebo at fasting and 2 h after the meal (Fig. 2).

LDL: The cholesterol content was significantly lower after ezetimibe than after placebo at fasting and at each time point after the meal ($p < 0.05$) (Fig. 3) with a significantly lower tAUC (Table 2). As a consequence of the decrease in the cholesterol content, the cholesterol/triglycerides ratio was significantly reduced after ezetimibe than after placebo at fasting and all over the postprandial phase (Fig. 3). ApoB-100 concentrations were lower after ezetimibe ($p < 0.05$ at 6 h) (Fig. 3) with a significant reduction also in tAUC (Table 2). No significant differences in iAUC for lipids and apoBs were observed.

LDL: The cholesterol and apoB-100 content as well as the cholesterol/triglyceride ratio in LDL were significantly lower after ezetimibe at fasting and at each point of the curve (Fig. 3) with a significant reduction in the tAUC (Table 2).

HDL: Cholesterol and triglyceride concentrations in HDL were not affected by either treatment (Table 2).

3.2.3. Plasma glucose and insulin

Glucose levels were comparable at fasting (147 ± 55 vs. 158 ± 36 mg/dl) and over the postprandial phase (2 h 202 ± 46 vs. 193 ± 55 ; 4 h 136 ± 34 vs. 133 ± 48 ; 6 h 105 ± 31 vs. 110 ± 38 mg/dl; tAUC 1147 ± 55 vs. 1143 ± 78 mg/dl \times 6 h; after placebo and ezetimibe, respectively). Insulin postprandial tAUC was lower after ezetimibe (155 ± 74 μ U/ml \times 6 h) than after placebo (173 ± 90 μ U/ml \times 6 h) ($p = 0.06$). Insulin levels were particularly lower after ezetimibe in the late postprandial phase, reaching statistical significance at 4 h (13 ± 5.8 vs. 18.1 ± 8.2 μ U/ml; $p < 0.05$).

4. Discussion

This double-blind randomized intervention study in type 2 diabetes shows that a 6-week treatment with ezetimibe + simvastatin compared with placebo + simvastatin, beside the well known effects on LDL cholesterol and apoB-100 content, has additional favourable effects on fasting and postprandial triglyceride-rich lipoproteins. In fact, ezetimibe induced (a) a reduction in chylomicron lipids, particularly cholesterol, both at fasting and after the meal, suggesting that cholesterol-poor chylomicrons were produced, (b) a reduction in the number of circulating chylomicrons, as shown by lower postprandial apoB-48 levels, and (c) a reduction in the cholesterol content of large VLDL, which suggests the formation of lesser chylomicron and liver-derived remnants. All these effects contribute to a potentially less atherogenic profile. In fact, a reduced number of cholesterol-poor intestinally derived lipoproteins as well as cholesterol-poor VLDLs may have a smaller impact on atherogenesis [2].

This is the first time that postprandial lipoprotein data have been obtained in a controlled intervention study in patients with type 2 diabetes. This is relevant since these patients are characterized by postprandial lipoprotein abnormalities that can contribute to a high vascular risk. Data in humans showing the effects of ezetimibe on fasting and, especially, on postprandial lipoprotein composition

Table 2

Postprandial total area under the curve for lipids (mg/dl × 6h) and B apolipoproteins (mg/l × 6h) in whole plasma and plasma lipoproteins at the end of the two treatments.

	Placebo + simvastatin				Ezetimibe + simvastatin			
	Cholesterol	Triglycerides	ApoB-48	ApoB-100	Cholesterol	Triglycerides	ApoB-48	ApoB-100
Plasma	883 ± 134	997 ± 634	53 ± 44	4337 ± 798	735 ± 120**	885 ± 405	43 ± 22	3591 ± 646**
Chylomicrons	8.3 ± 8.8	189 ± 155	0.43 ± 0.54	ND	4.4 ± 2.7*	152 ± 82	0.20 ± 0.20	ND
Large VLDL	59 ± 56	429 ± 370	9.9 ± 12	86 ± 32	42 ± 29	358 ± 246	6.3 ± 4.0	90 ± 36
Small VLDL	29 ± 17	89 ± 45	6.4 ± 3.0	148 ± 71	23 ± 11	84 ± 38	6.0 ± 2.0	128 ± 50
IDL	33 ± 10	32 ± 9	NM	202 ± 53	26 ± 11*	29 ± 7	NM	163 ± 55*
LDL	452 ± 116	92 ± 21	NM	2901 ± 634	334 ± 80**	89 ± 26	NM	2297 ± 504**
HDL	248 ± 55	121 ± 57	NM	NM	246 ± 58	106 ± 40	NM	NM

ND: not detectable; NM: not measured.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.001$ vs. Placebo + simvastatin.

are very limited. In a non-controlled study in patients with type IIb hyperlipidaemia ezetimibe reduced postprandial but not fasting cholesterol and triglyceride levels in VLDL and chylomicrons after an oral fat load [14]. In obese patients with the metabolic syndrome ezetimibe 10 mg/simvastatin 10 mg compared with simvastatin 80 mg significantly reduced the cholesterol content of triglyceride-rich lipoproteins [15].

The mechanisms for the daylong effects of ezetimibe on intestinal particles may be related to the mechanism of action of this drug, i.e. its inhibition of dietary cholesterol transfer from the intestinal lumen to enterocytes, acting on the Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) transporter [10]. Our observation that ezetimibe effects were present not only in the postprandial period but also at fasting are likely consequent to the physiological characteristics of intestinal cholesterol absorption. After a meal, the dietary cholesterol that reaches the intestinal lumen is taken up by the enterocyte brush border and is only slowly secreted into chylomicrons. This has been shown in experiments in healthy humans where the secretion into chylomicrons of dietary cholesterol was not concomitant with the meal but was accomplished in several subsequent postprandial phases according to a “waves model” [19,20]. Thus, the effects of ezetimibe on chylomicron cholesterol content may not be evident immediately after a single meal but in several successive hours, after several meals, and even in the fasting condition. In addition, ezetimibe could act on the absorption not only of dietary

but also of biliary cholesterol, in a continuous process independent from food assumption.

On the other hand, we cannot exclude that some of the results obtained in our study may be additional effects of the decrease of fasting plasma cholesterol under the combined therapy (simvastatin + ezetimibe).

In the present study chylomicron apoB-48 concentrations after meal were about 50% lower with ezetimibe than with placebo. This decrease suggests that ezetimibe reduces the number of intestinal particles, as also indicated by a kinetic study in males with mixed hyperlipidaemia [21]. In that study the combination ezetimibe/simvastatin, compared to statins alone, significantly reduced the secretion of apoB-48 particles. Such effect may be related to the reduction, particularly in the postprandial phase, in the cholesterol esters available in enterocytes for the apoB-48 stabilization [22]. Moreover, as suggested by Taggart et al. [7], the action of ezetimibe on the number of intestinal lipoproteins may be particularly relevant in type 2 diabetic patients who specifically respond to dietary cholesterol with an increased production of apolipoprotein B-48 containing particles.

In our study ezetimibe, at similar plasma glucose levels, significantly reduced plasma insulin concentrations in the late postprandial phase, as well as the fasting insulin/glucose ratio, indicating an improved insulin-sensitivity. This new, interesting

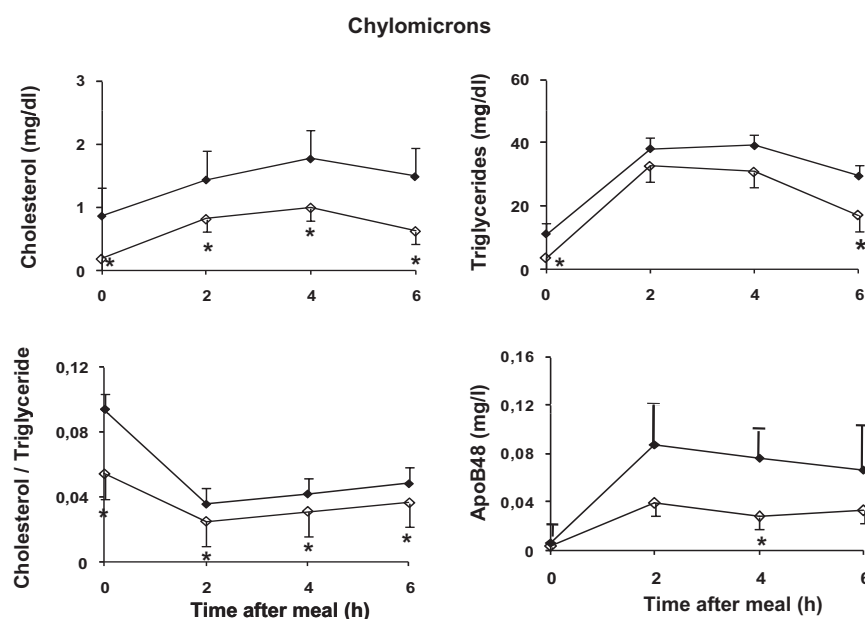


Fig. 1. Postprandial cholesterol, triglycerides, cholesterol/triglyceride ratio, and apoB-48 concentrations in chylomicrons with ezetimibe (open diamonds) and placebo (filled circles) treatment. Repeated measures ANOVA $p < 0.05$ for cholesterol and cholesterol/triglyceride ratio; * $p < 0.05$ by paired samples t -test.

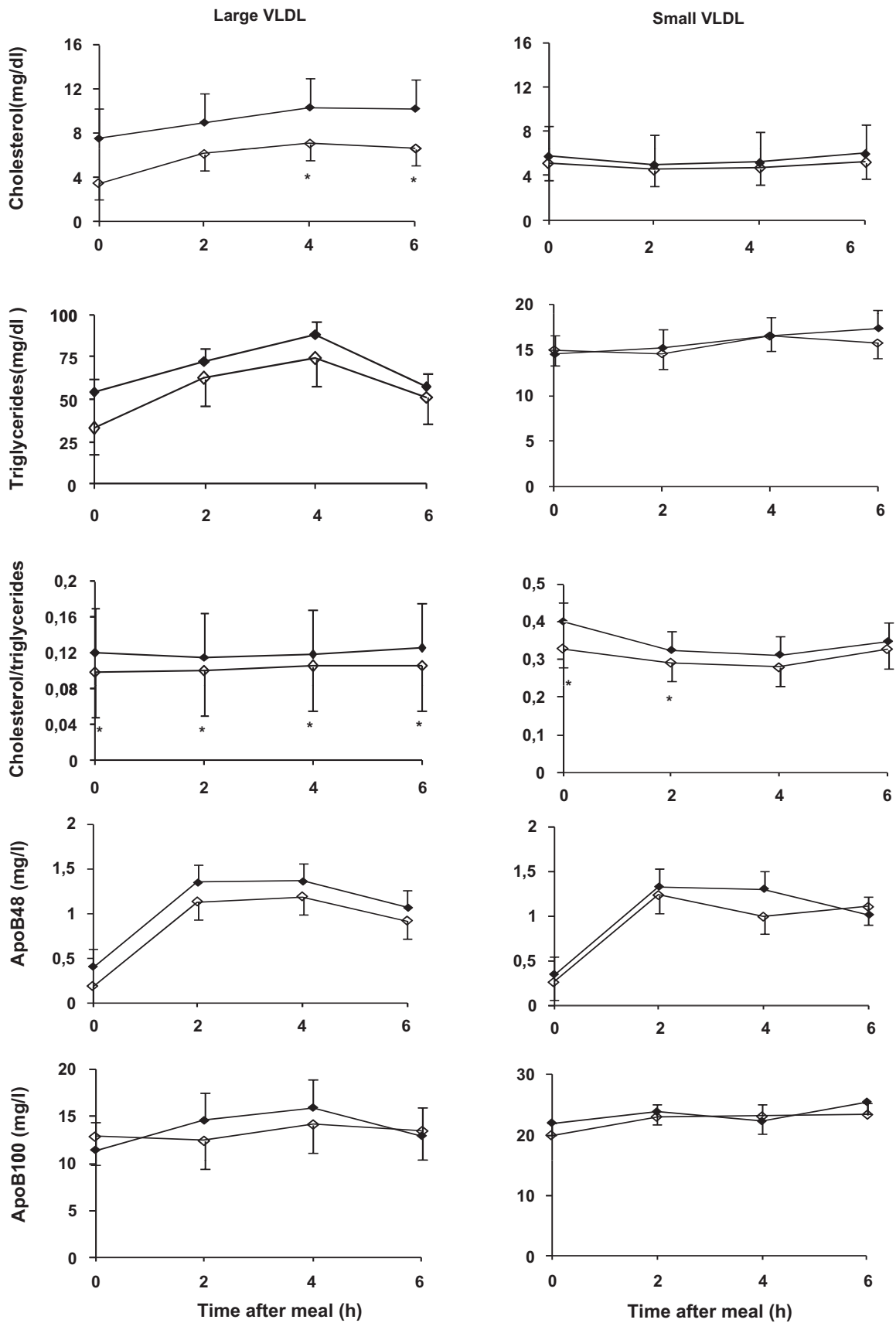


Fig. 2. Postprandial cholesterol, triglycerides, cholesterol/triglyceride ratio, apoB-48 and apoB-100 concentrations in large and small VLDL with ezetimibe (—◇—) and placebo (—●—) treatment. * $p < 0.05$ by paired samples t-test.

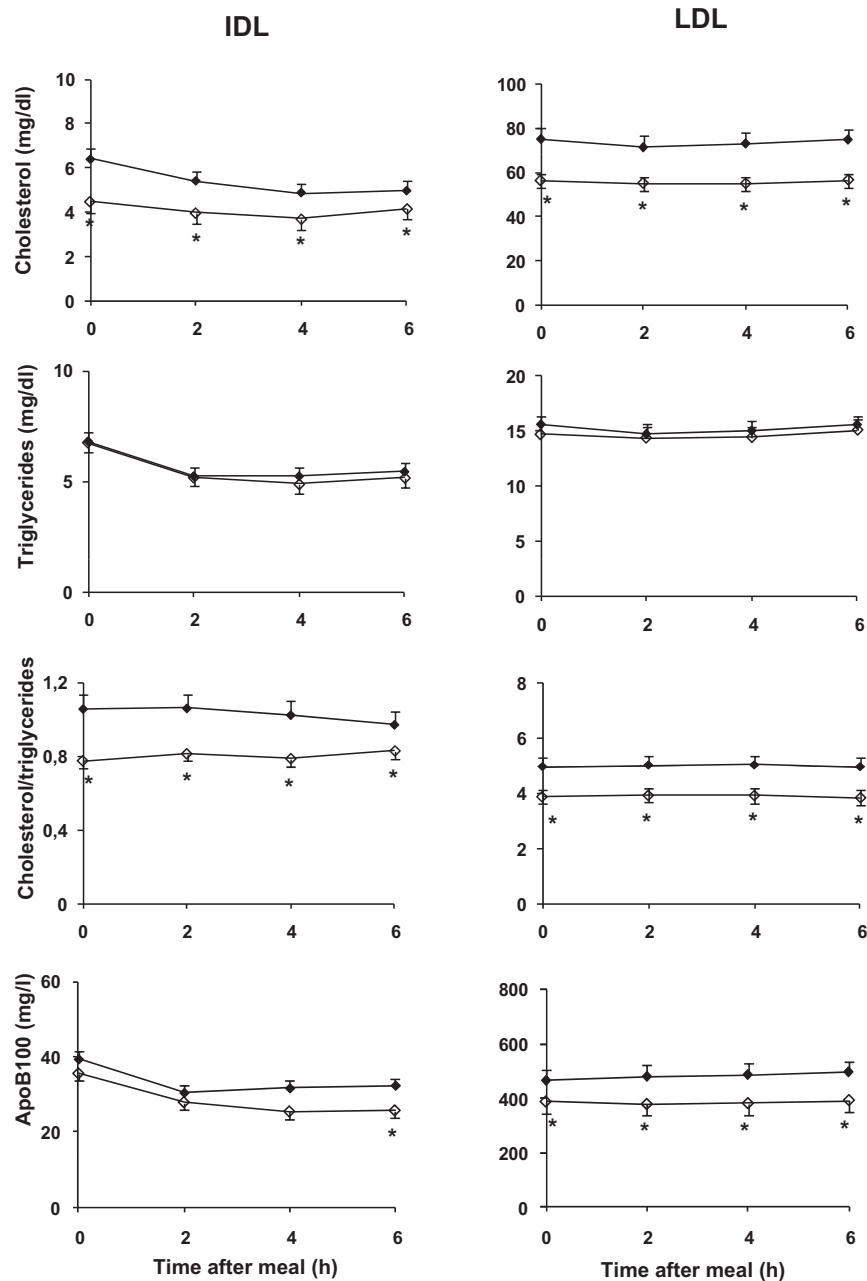


Fig. 3. Postprandial cholesterol, triglycerides, apoB-48 and apoB-100 concentrations in IDL and LDL with ezetimibe and placebo treatment. Repeated measures ANOVA $p < 0.05$ for cholesterol and cholesterol/triglyceride ratio; * $p < 0.05$ by paired samples t -test.

result may be related to a reduction of liver fat reported recently in animals and humans treated with ezetimibe [23,24]. Since insulin-resistance is associated with an increased production of apoB-48 containing particles [8], ezetimibe may be effective in reducing the number of chylomicrons in type 2 diabetes patients also through the improvement of intestinal insulin-sensitivity. On the other hand, an increased catabolism of apoB-48 particles with ezetimibe through an enhanced activity of LDL hepatic receptors cannot be excluded.

In the present study cholesterol content in VLDL, IDL and LDL was reduced after ezetimibe as indicated by their lower cholesterol/triglyceride ratio both at fasting and all over the postprandial phase. The formation of cholesterol poor particles was possibly secondary to the reduced availability of cholesterol for VLDL synthesis but also to a direct effect of ezetimibe on hepatic NPC1L1, inhibiting the cholesterol transfer from the biliary tract to the hepatocyte.

Consistent with previous findings [21], we observed that ezetimibe did not reduce VLDL apoB-100, whereas it reduced apoB-100 in IDL and LDL. This suggests a reduction, both at fasting and in the postprandial period, in the number of the latter particles, related to an increased rate of their hepatic uptake following the up-regulation of hepatic LDL receptors, as also observed in animals treated with ezetimibe [25].

Some strengths and limitations of this study should be considered. In fact, this is the first randomized double blind trial exploring the effects of ezetimibe on fasting and postprandial lipoprotein profile in patients with type 2 diabetes, who could mostly benefit from this kind of treatment in consideration of their typical abnormalities in intestinal derived lipoproteins. Concerning the possible limitations, as only well controlled type 2 diabetic patients were studied, our results may not be directly applicable to diabetic patients in bad glycaemic control, although these patients could

gain even greater benefit from this treatment. Moreover, while our results on lipid metabolism allow the claim that the combination ezetimibe/simvastatin leads to a potentially less atherogenic lipid profile, we cannot translate these changes into possible effects on cardiovascular events. To this respect, only long term intervention studies with hard end-points (cardiovascular events) could provide definitive answers.

In conclusion, ezetimibe, beyond the well known effects on LDL, positively influences lipoprotein profile both at fasting and postprandially in patients with type 2 diabetes by favouring the production of cholesterol-poor chylomicrons and VLDL which are considered less atherogenic particles. The postprandial effects of ezetimibe on the triglyceride-rich lipoprotein composition mainly reflect the effects observed at fasting, revealing a chronic action of ezetimibe on the intestinal absorption of cholesterol.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to disclose in relation to this study.

Acknowledgement

This study has been performed with the unconditioned support of Merck Sharpe and Dhome.

References

- [1] Hyson D, Rutledge JC, Berglund L. Postprandial lipemia and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2003;5:437–44.
- [2] Mero N, Malmstrom R, Steiner G, Taskinen MR, Syvanne M. Postprandial metabolism of apolipoprotein B-48- and B-100-containing particles in type 2 diabetes mellitus: relations to angiographically verified severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000;150:167–77.
- [3] Annuzzi G, De Natale C, Iovine C, et al. Insulin resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2397–402.
- [4] Curtin A, Deegan P, Owens D, et al. Elevated triglyceride-rich lipoproteins in diabetes. A study of apolipoprotein B-48. *Acta Diabetol* 1996;33:205–10.
- [5] Brunzell JD, Hazzard WR, Porte Jr D, Bierman EL. Evidence for a common, saturable, triglyceride removal mechanism for chylomicrons and very low density lipoproteins in man. *J Clin Invest* 1973;52:1578–85.
- [6] Annuzzi G, Giacco R, Patti L, et al. Postprandial chylomicrons and adipose tissue lipoprotein lipase are altered in type 2 diabetes independently of obesity and whole-body insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:531–8.
- [7] Taggart C, Gibney J, Owens D, et al. The role of dietary cholesterol in the regulation of postprandial apolipoprotein B48 levels in diabetes. *Diabet Med* 1997;14:1051–8.
- [8] Adeli K, Lewis GF. Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:221–8.
- [9] Hogue JC, Lamarche B, Tremblay AJ, et al. Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *J Lipid Res* 2007;48:1336–42.
- [10] Nutescu EA, Shapiro NL. Zetimibe: a selective cholesterol absorption inhibitor. *Pharmacotherapy* 2003;23:1463–74.
- [11] Davidson MH, Toth PP. Combination therapy in the management of complex dyslipidemias. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:423–31.
- [12] Wilhelm MG, Cooper AD. Induction of atherosclerosis by human chylomicron remnants: a hypothesis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:132–9.
- [13] van Heek M, Compton DS, Davis HR. The cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases diet-induced hypercholesterolemia in monkeys. *Eur J Pharmacol* 2001;415:79–84.
- [14] Masuda D, Nakagawa-Toyama Y, Nakatani K, et al. Ezetimibe improves postprandial hyperlipidaemia in patients with type IIb hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest* 2009;39:689–98.
- [15] Hajer GR, Dall'Aglio GM, van Vark-van der Zee LC, Visseren FL. The effect of statin alone or in combination with ezetimibe on postprandial lipoprotein composition in obese metabolic syndrome patients. *Atherosclerosis* 2009;202:216–24.
- [16] Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, et al. Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2153–9.
- [17] Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979;241:2035–8.
- [18] Kinoshita M, Kojima M, Matsushima T, Teramoto T. Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA. *Clin Chim Acta* 2005;351:115–20.
- [19] Dubois C, Armand M, Ferezou J, et al. Postprandial appearance of dietary deuterated cholesterol in the chylomicron fraction and whole plasma in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 1996;64:47–52.
- [20] Beaumier-Gallon G, Dubois C, Senft M, et al. Dietary cholesterol is secreted in intestinally derived chylomicrons during several subsequent postprandial phases in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2001;73:870–7.
- [21] Tremblay AJ, Lamarche B, Hogue JC, Couture P. Effects of ezetimibe and simvastatin on apolipoprotein B metabolism in males with mixed hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2009;50:1463–71.
- [22] Pal S, Allister E, Thomson A, Mamo JC. Cholesterol esters regulate apoB48 secretion in CaCo2 cells. *Atherosclerosis* 2002;161:55–63.
- [23] Zheng S, Hoos L, Cook J, et al. Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Eur J Pharmacol* 2008;584(1):118–24.
- [24] Park H, Shima T, Yamaguchi K, et al. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2010 Jul;24 [Epub ahead of print].
- [25] Repa JJ, Turley SD, Quan G, Dietschy JM. Delineation of molecular changes in intrahepatic cholesterol metabolism resulting from diminished cholesterol absorption. *J Lipid Res* 2005;46:779–89.

Short Report: Treatment

Effects of meals with different glycaemic index on postprandial blood glucose response in patients with Type 1 diabetes treated with continuous subcutaneous insulin infusion

M. Parillo, G. Annuzzi*, A. A. Rivellese*, L. Bozzetto*, R. Alessandrini*, G. Riccardi* and B. Capaldo*

AORN S. Anna S. Sebastiano Hospital, Caserta, and *Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Napoli, Italy

Accepted 18 October 2010

Abstract

Objective To evaluate the impact of high-glycaemic index and low-glycaemic index meals on postprandial blood glucose in patients with Type 1 diabetes treated with continuous subcutaneous insulin infusion.

Methods Sixteen patients with Type 1 diabetes under continuous subcutaneous insulin infusion treatment, age 36 ± 0.5 years (mean \pm SEM), HbA_{1c} $7.6 \pm 0.2\%$ (56 ± 1.1 mmol/mol), consumed two test meals with an identical macronutrient composition, but with a different glycaemic index: 59 vs. 90. Blood glucose was checked before the test meal and every 30 min thereafter for 180 min. The same preprandial insulin dose was administered on the two occasions.

Results Blood glucose concentrations following the low-glycaemic index meal were significantly lower than those of the high-glycaemic index meal ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). The blood glucose area under the curve after the low-glycaemic index meal was 20% lower than after the high-glycaemic meal ($P = 0.006$).

Conclusions Our data show that meals with the same carbohydrate content but a different glycaemic index produce clinically significant differences in postprandial blood glucose.

Diabet. Med. 28, 227–229 (2011)

Keywords carbohydrate, CSII, glycaemic index, insulin treatment, type 1 diabetes

Introduction

Dietary factors, in particular carbohydrate, influence postprandial glycaemic excursions in patients with diabetes mellitus [1]. The American Diabetes Association recommendations for dietary management emphasize the importance of the quantity over the quality of carbohydrate [2]. This leaves aside the glycaemic index (GI) of foods, which expresses the rise in blood glucose occurring after the consumption of a food containing a standard amount of carbohydrate, relative to the rise after a similar amount of a reference food (bread or glucose) [3]. Although no method for carbohydrate estimation has proven superior in the management of patients with Type 1 diabetes, the pre-meal insulin bolus is generally calculated on the amount of carbohydrate (counting of carbohydrate), not considering

the glycaemic index of the meal [4]. Studies using the continuous glucose monitoring system in healthy adults suggest that low-glycaemic index diets confer a more favourable blood glucose profile [5,6]. Similar results were obtained in patients with Type 1 diabetes, in whom the consumption of a low-glycaemic index - diet was associated with reduced blood glucose excursions and better glycaemic control [7,8]. The aim of our study was to evaluate the impact of high and low glycaemic index - meals on postprandial blood glucose in patients with Type 1 diabetes on continuous subcutaneous insulin infusion.

Research design and methods

Sixteen patients with Type 1 diabetes under continuous subcutaneous insulin infusion treatment for more than 1 year, mean age 36 ± 0.5 years (mean \pm SEM), BMI 24.6 ± 0.2 kg/m², diabetes duration 14 ± 2 years, HbA_{1c} $7.6 \pm 0.2\%$ (56 ± 1.1 mmol/mol), were recruited at the outpatient clinic

Correspondence to: Mario Parillo, AORN S. Anna S. Sebastiano Hospital, Caserta, Italy. E-mail: mparill@tin.it

of the Department of Internal Medicine, Federico II University (Napoli, Italy). The study was approved by the Institutional Ethics Committee and all subjects gave their informed consent.

On two different occasions, 1 week apart, patients consumed, in a random order, two test meals with identical main nutrient composition (carbohydrate *c.* 100 g, fat 28 g, protein 38 g, fibre 12 g, *c.* 790 kcal), but with different glycaemic index: 59 or 90. The glycaemic index of food was estimated on the basis of the International Glycaemic Index Tables, using bread as a reference [9]. The meals were prepared in the metabolic kitchen and were consumed at the same time of the day (12.30 h) on the two occasions. In the low glycaemic index - meal, carbohydrate was derived principally from legumes and pasta, while in the high glycaemic index meal carbohydrate was derived from bread and rice. The composition of the meals is reported in Table 1. On the morning of the test, subjects consumed the same standardized breakfast; they abstained from heavy physical exercise in the previous 24 h. All subjects used ultra-rapid insulin analogues. Basal insulin infusion and preprandial boluses were kept constant on the two occasions. Preprandial bolus was calculated on the basis of the carbohydrate content of the meal adjusted for the insulin sensitivity of each subject.

Blood glucose was checked before the test meal and every 30 min thereafter for 180 min on fingertip capillary blood using a test reflocheck (Accu-Chek; Roche, Mannheim, Germany).

Data are expressed as mean \pm standard error. Overall differences between the two test meals were assessed by repeated-measures ANOVA. Differences in blood glucose at each time point were evaluated by paired Student's *t*-test corrected for multiple comparison (Bonferroni).

Results

The pre-meal insulin bolus was 5.6 ± 0.2 UI (range 4.0–8.0 UI).

Blood glucose concentrations before the test meal were similar on the two occasions (high glycaemic index - meal = 7.2 ± 0.6 mmol/L and low glycaemic meal = 7.0 ± 0.7 mmol/L, $P = \text{NS}$). Blood glucose profiles after the two meals are shown in Fig. 1. Blood glucose concentrations following the low glycaemic index meal were significantly lower than following the high glycaemic index meal, with a 2.0- to 2.5-mmol/L difference at 60–150 min ($P < 0.05$ –0.01). Blood glucose total

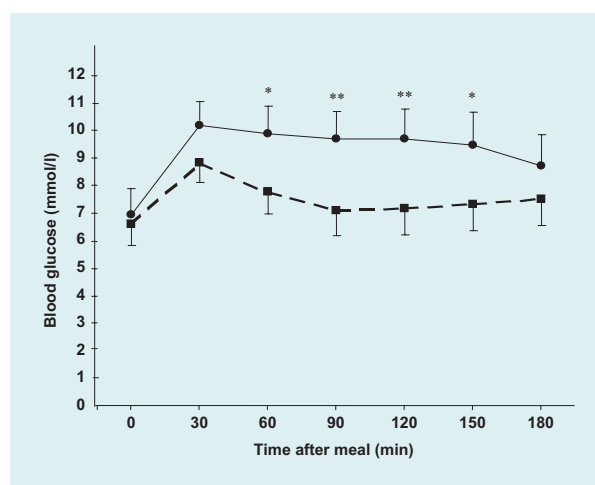


FIGURE 1 Blood glucose levels in response to the high glycaemic index (—) and the low glycaemic index (---) meals. Mean \pm SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. low glycaemic index meal.

Table 1 Composition of the low- and high-glycaemic index meals

	Protein (g)	Fat (g)	Carbohydrate (g)	Fibre (g)	kcal	Glycaemic Index
High glycaemic index meal						
Rice 50 g	3.4	0.2	40.2	0.5	166	91
Artichoke 150 g	4.0	0.3	3.8	7.5	33	48
Tomato 100 g	1.2	0.2	2.8	1.0	17	27
Tuna fish 80 g	20.3	1.5	—	—	92	—
White bread 65 g	5.6	0.3	43.5	2.1	188	100
Olive oil 25 g	—	25	—	—	225	—
Banana 90 g	1.1	0.3	13.8	0.9	58	76
Total	36	28	104	12	779	90*
Low glycaemic index meal						
Pasta 90 g	9.8	1.3	71.2	2.4	318	64
Beans 70 g	4.2	0.2	8.8	3.4	53	40
Tomato 300 g	3.6	0.6	8.4	3	51	38
Tuna fish 80 g	20.3	1.5	—	—	92	—
Olive oil 25 g	—	25	—	—	225	—
Apple 150 g	0.3	—	15	3.9	57	52
Total	38	28	103	13	796	59*

*Obtained by dividing total glycaemic load by total carbohydrate.

area under the curve was 1399 ± 120 mmol/l \times 180 min after the low glycaemic index meal and 1757 ± 123 mmol/l \times 180 min after the high glycaemic index meal ($P = 0.006$).

Conclusions

Our data show that meals with the same carbohydrate content but different glycaemic indices produce clinically significant differences in postprandial blood glucose in patients on continuous subcutaneous insulin infusion. In particular, the glycaemic response to the low glycaemic index meal was 20% lower than that to the high glycaemic index meal.

Several randomized clinical trials have reported a significant improvement in HbA_{1c} and postprandial blood glucose with a low glycaemic index diet in patients with Type 1 diabetes [7,8,10–14]. Of note, postprandial glycaemia is emerging as a key therapeutic strategy in the prevention of diabetic complications [15]. More specifically, the meta-analysis by Brand-Miller *et al.* [12] reported a 10% reduction in HbA_{1c} in patients with Type 1 diabetes when a low glycaemic index diet was consumed. Two recent studies evaluated the effect of meals with different glycaemic index on postprandial blood glucose in young patients with Type 1 diabetes. Nansel *et al.* [7] showed that a low-glycaemic diet significantly lowered mean daytime blood glucose compared with a high-glycaemic diet in patients (mean age 13 years) on basal-bolus regimen. Similar results were reported by Ryan *et al.* [15] who evaluated the effects of test breakfasts with different glycaemic indices in children receiving multiple daily insulin injections. However, in their position statement on nutrition recommendations [2], the American Diabetes Association underlines the importance of matching preprandial insulin doses to the carbohydrate content of the meal, without taking into consideration the glycaemic index of the meals. Following this recommendation, carbohydrate counting, which takes into account only the quantity of carbohydrate, is generally used for adjusting pre-meal insulin dose in patients with continuous subcutaneous insulin infusion, and no changes are made according to the GI of the meal. This is in spite of the fact that meals with an identical composition of macronutrients are digested and absorbed at different rates and produce a range of glycaemic responses that can be predicted, at least in part, from their glycaemic indices [3].

To our knowledge this is the first study to have evaluated the effect of a low glycaemic index meal in adult patients with Type 1 diabetes treated with continuous subcutaneous insulin infusion. A limitation of the study is that more moderate differences in the glycaemic index of the meal may result in less significant alterations in postprandial glucose.

Our results show that carbohydrate counting could be not reliable when dietary habits are characterized by wide variation in the quality of carbohydrate. New methods for calculation of pre-meal insulin doses, also taking into account the glycaemic indices of meals, would be of great clinical usefulness.

Author contributions

MP researched the data and wrote the manuscript, GA, AAR, GR and BC contributed to the discussion and reviewed the manuscript, and LB and RA researched the data.

Competing interests

Nothing to declare.

References

- 1 Parillo M, Riccardi G. Dietary carbohydrate and glucose metabolism in diabetic patients. *Diabetes Metab* 1995; **21**: 391–401.
- 2 American Diabetes Association. Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2008; **31**: S61–S78.
- 3 Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM *et al.* Glycaemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr* 1981; **34**: 362–366.
- 4 Brynes AE, Adamson J, Dornhorst A, Frost GS. The beneficial effect of a diet with low glycaemic index on 24 h glucose profiles in healthy young people as assessed by continuous glucose monitoring. *Br J Nutr* 2005; **93**: 179–182.
- 5 Kawamura T. The importance of carbohydrate counting in the treatment of children with diabetes. *Pediatr Diabetes* 2007; **8**: S57–62.
- 6 Hui LL, Nelson EA, Choi KC, Wong GW, Sung R. Twelve-hour glycemic profiles with meals of high, medium, or low glycaemic load. *Diabetes Care* 2005; **28**: 2981–2983.
- 7 Nansel TR, Gellar L, McGill A. Effect of varying glycemic index meals on blood glucose control assessed with continuous glucose monitoring in youth with type 1 diabetes on basal-bolus insulin regimens. *Diabetes Care* 2008; **31**: 695–697.
- 8 Rovner AJ, Nansel TR, Gellar L. The effect of a low-glycemic diet vs. a standard diet on blood glucose levels and macronutrient intake in children with type 1 diabetes. *J Am Diet Assoc* 2009; **109**: 303–307.
- 9 Atkinson FS, Foster-Powell K, Brand-Miller JC. International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. *Diabetes Care* 2008; **31**: 2281–2283.
- 10 Brynes AE, Lee JL, Brighton RE, Leeds AR, Dornhorst A, Frost GS. A low glycemic diet significantly improves the 24-h blood glucose profile in people with type 2 diabetes, as assessed using the continuous glucose MiniMed monitor. *Diabetes Care* 2003; **26**: 548–549.
- 11 Barclay AW, Petocz P, McMillan-Price J, Flood VM, Prvan T, Mitchell P *et al.* Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk—a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 2008; **87**: 627–637.
- 12 Brand-Miller JC, Petocz P, Hayne S, Colagiuri S. Low-glycemic index diets in the management of diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care* 2003; **26**: 2261–2267.
- 13 Giacco R, Parillo M, Rivellese AA, Lasorella G, Giacco A, D'Episcopo L *et al.* Long-term dietary treatment with increased amounts of fiber-rich low-glycemic index natural foods improves blood glucose control and reduces the number of hypoglycemic events in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000; **23**: 1461–1466.
- 14 Ceriello A, Colagiuri S. International Diabetes Federation guideline for management of post-meal glucose: a review of recommendations. *Diabet Med* 2008; **25**: 1151–1156.
- 15 Ryan RL, King BR, Anderson DG, Attia JR, Collins CE, Smart CE. Influence of and optimal insulin therapy for a low-glycemic index meal in children with type 1 diabetes receiving intensive insulin therapy. *Diabetes Care* 2008; **31**: 1485–1490.